



**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**

**Μελέτη της θεραπευτικής επίδρασης της
σιλοσταζόλης στη φλεγμονώδη απόκριση και την
εξέλιξη της ισχαιμίας άκρου σε μύες**

Διδακτορική διατριβή

του

**Παρόνη Ευθύμιου,
Τ. Γεωπόνου, MSc**

ΑΘΗΝΑ 2020

Στη ΜΗΤΕΡΑ μου που μου λείπει πολύ

*Στον ΠΑΤΕΡΑ μου και τη ΣΥΖΥΓΟ μου
που στέκονται δίπλα μου*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν στο Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών μετά από την ανάθεση του θέματος από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αγγειοχειρουργικής κ. Ανδρέα Λάζαρη. Οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιστολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών και στο Βιοχημικό εργαστήριο του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω θερμά εκ βάθους καρδιάς τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αγγειοχειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ κ. Ανδρέα Λάζαρη για την ανάθεση του θέματος της διδακτορικής αυτής διατριβής, την εμπιστοσύνη προς το πρόσωπό μου, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε ιδιαίτερα στις δύσκολες στιγμές που η ερευνητική προσπάθεια έδειχνε να οδηγείται σε αδιέξοδο. Τον ευχαριστώ επίσης για την πλήρη συμπαράσταση σε όλους τους τομείς μέχρι την επιτυχή ολοκλήρωση της προσπάθειάς μου.

Θερμά ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Αγγειοχειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ κ. Ιωάννη Κακίση για την αμέριστη υποστήριξη και παρότρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής καθώς και σε άλλα ερευνητικά έργα.

Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο Διευθυντή της Αγγειοχειρουργικής Κλινικής και Καθηγητή Αγγειοχειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ κ. Γερουλάκο Γεώργιο. Τον ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε και την αμέριστη στήριξή του στα πρώτα μου επιστημονικά βήματα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ πρέπει να πω και στον Καθηγητή Αγγειοχειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ κ. Σπυρίδωνα Βασδέκη για τον πολύτιμο χρόνο του.

Θερμές ευχαριστίες πρέπει να εκφράσω και στο Ακαδημαϊκό Ερευνητή Α' στο ΙΙΒΕΑΑ κ. Δημήτριο Θανο για την πολύτιμη υποστήριξη που μου παρείχε καθώς και για τη θερμή με την οποία αγκάλιασε το δύσκολο αυτό εγχείρημα.

Δεν θα υπήρχε η παρούσα εργασία χωρίς τη βοήθεια και καθοδήγηση της Καθηγήτριας του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, κ. Ουρανίας Τσιτσιλώνη

καθώς και χωρίς την πολύτιμη συμβολή της Ερευνήτριας του Εργαστηρίου Ραδιοχημικών Μελετών, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ Πηνελόπης Μπουζιώτη,

Επίσης θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω το σεβαστό μου Καθηγητή Χειρουργικής κ. Παναγιώτη Καραγιαννάκο ο οποίος, ως διευθυντής του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, με δίδαξε πώς να λειτουργώ μέσα στο ερευνητικό περιβάλλον και μου ενέπνευσε το όραμα της αέναης εξέλιξης που ο ίδιος κατέχει στον υπερθετικό βαθμό. Μετά από τόσα χρόνια, οι συμβουλές του αποτελούν πλέον οδηγό όχι μόνο για την επιστημονική, αλλά και την προσωπική εξέλιξη της πορείας μου.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Νικόλαο Κωστομητσόπουλο, Υπεύθυνο της Μονάδας Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ο οποίος περιέβαλε με αγάπη και ενδιαφέρον τον ερευνητικό στόχο μου και συνέβαλλε αποφασιστικά στην επίτευξή του. Οι συμβουλές του κατά τη διάρκεια των πρώτων αποτυχημένων πειραμάτων αποτέλεσαν για μένα έμπνευση και μου έδωσαν κουράγιο να συνεχίσω. Τον ευχαριστώ όμως περισσότερο για την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλλε, δίνοντάς μου παραδείγματα ήθους και επαγγελματισμού.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στον Δρ. Μιχάλη Κατσιμπούλα για την ανάπτυξη του πειραματικού χειρουργικού μοντέλου και τον Δρ. Νικόλαο Καδόγλου για τη βοήθειά του στη συγγραφή του παρόντος και την αμέριστη επιστημονική και ηθική συμπαράστασή του στις δύσκολες στιγμές αυτής της διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω ολόψυχα τους φίλους και συνεργάτες μου κ.κ. Ευάγγελο Μπαλάφα, Πάυλο Αλεξάκο, Άννα Αγαπάκη, Δρ. Αθανάσιο Σταυρόπουλο και ιδιαιτέρως τη Δρ. Μαριάννα Στασινοπούλου. Η συμβολή τους στην υλοποίηση των πειραμάτων και των εργαστηριακών αναλύσεων ήταν καθοριστική και χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί το δύσκολο τεχνικό κομμάτι της διδακτορικής μου διατριβής. Τους ευχαριστώ για τον ελεύθερο χρόνο που θυσίασαν και την προσπάθεια που κατέβαλλαν ανιδιοτελώς για να έρθει εις πέρας η παρούσα ερευνητική εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να τον πατέρα μου Χρήστο για τις θυσίες που έκανε όλα αυτά τα χρόνια για μένα και κυρίως για τις αρχές που μου εμφύσησε. Ένα μεγάλο ευχαριστώ

επίσης οφείλω στη σύζυγό μου Μάρθα για την υπομονή της όλα αυτά τα χρόνια
εκπόνησης της διατριβής μου.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

A) Ημερομηνία αιτήσεως υποψηφίου: 19/7/13

B) Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 09/04/2014

Γ) Μέλη 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- 1) Ανδρέας Λάζαρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής (Επιβλέπων)
- 2) Ιωάννης Κακίσης, Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής
- 3) Γερούλακος Γεώργιος Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής

Δ) Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 15/6/16

Ε) Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής:

ΣΤ) Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής:, Σφηκάκης Πέτρος, Καθηγητής

Z) Μέλη 7μελους εξεταστικής επιτροπής:

- 1) Ανδρέας Λάζαρης, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 2) Ιωάννης Κακίσης, Καθηγητής
- 3) Γεώργιος Γερούλακος Καθηγητής
- 4) Πηνελόπη Μπουζιώτη Ερευνήτρια Α
- 5) Ουρανία Τσιτσιλώνη Καθηγήτρια
- 6) Δημήτριος Θάνος Ερευνητής Α
- 7) Σπυρίδων Βασδέκης Καθηγητής

Η) ΒΑΘΜΟΣ:

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥ-
ΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ
ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ
ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ
ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝ-
ΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ
ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ
ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ
ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ’
ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ
ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ
ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ
ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.
ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ
ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΙΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ
ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΑΠ’ ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ
ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟ-
ΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ,
ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ’ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η
ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ
ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧ-
ΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟ-
ΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΛΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Σ' ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΘΕΕΣ, ΠΟΥ ΒΑΖΩ ΜΑΡΤΥΡΕΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΊΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΝΩ ΚΟΙΝΩΝΟ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΦΕΡΩ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΚΑ ΜΟΥ ΟΤΙ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΞΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ, ΑΝ ΕΠΙΘΥΜΟΥΝ ΝΑ ΜΑΘΟΥΝ ΧΩΡΙΣ ΜΙΣΘΟ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΥΜΦΩΝΙΑ, ΟΤΙ ΘΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΤΟΥΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΑΝΟΝΕΣ, ΤΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΥΠΟΛΟΙΠΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΜΟΥ, ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΣΕ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΕΧΟΥΝ ΣΥΝΔΕΘΗ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΜΕ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ, ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΙΑΤΡΩΝ, ΚΑΙ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ ΑΛΛΟ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ.

ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ. ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΟΠΩΣΔΗΠΟΤΕ ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΣΧΟΥΝ ΑΠΟ ΠΕΤΡΑ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΣΤΟΥΣ ΕΞΑΣΚΗΜΕΝΟΥΣ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ. Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ ΣΕ ΣΩΜΑΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ Η ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΖΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΑΡΩΝΗΣ ΕΥΘΥΜΙΟΣ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- 1) Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος
- 2) Εθνικότητα: Ελληνική
- 3) Χρονολογία Γέννησης: 04 / 08 / 1974
- 4) Τόπος μόνιμης κατοικίας: Φιλικής Εταιρείας 8^A 15122 Μαρούσι Αττική
- 5) Τόπος γέννησης: Αθήνα
- 6) E-mail: eparonis@yahoo.com, eparonis@bioacademy.gr
- 7) Τηλέφωνο: 2106597425, [κιν] 6936742743

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 21/04/2014- : Υποψήφιος διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 2009-2012: Απόφοιτος Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με έδρα το Τμήμα Βιολογίας σε συνεργασία με την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με τίτλο «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική».
- 2001-2004: Απόφοιτος του Μεταπτυχιακού Προγράμματος (στα πλαίσια της εξ αποστάσεως εκπαίδευσης) με τίτλο «Διοίκηση Βιομηχανικών Επιχειρήσεων» και φορέα υλοποίησης το ΕΠΕΑΕΚ.
- 1994-1997: Πτυχίο Τεχνολόγου Γεωπόνου Τμήματος Ζωικής Παραγωγής της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας Κοζάνης (Παράρτημα Φλώρινας).

ΓΝΩΣΕΙΣ ΞΕΝΩΝ ΓΛΩΣΣΩΝ

Αγγλικά, άριστα, κάτοχος Proficiency

Γαλλικά, καλά, κάτοχος Certificate

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 2002 – σήμερα: Ειδικός Τεχνικός Επιστήμονας με αντικείμενο την Διαχείριση Μονάδων Ζωικών Προτύπων στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. **Paronis E**, Katsimpoulas M, Kadoglou NPE, Provost C, Stasinopoulou M, Spyropoulos C, Poulakis E, Prignon A, Kakisis I, Kostomitsopoulos GN, Bouziotis P, Kostopoulos VI, Tsitsilonis O, Lazaris A. (2020) Cilostazol mediates immune responses and affects angiogenesis during the acute phase of hind limb ischemia in a mouse model. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics (JCPT)* /2020.
2. Stasinopoulou M, Kadoglou NPE, Christodoulou E, **Paronis E**, Kostomitsopoulos NG, Valsami G, Liapis CD, Kakisis J. (2019) Statins' Withdrawal Induces Atherosclerotic Plaque Destabilization in Animal Model- A "Rebound" Stimulation of Inflammation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics (JCPT)* 03/2019.
3. **Paronis E**, Kapogiannatou A., Paschidis K, Stasinopoulou M, Alexakos P, Skaliora I, Kostomitsopoulos N.G. (2018) Lighting environment: What colour of light do male C57BL/6J prefer? *Applied Animal Behaviour Science*, Vol 209 08/2018.
4. Balafas E, Stasinopoulou M, Alexakos P, **Paronis E**, Paschidis K, Kostomitsopoulos N.G. (2018) 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. *Animal Technology and Welfare*, 06/2018, 17(1):9-11.
5. Samara P, Christoforidou N, Lemus C, Argyropoulou A, Ioannou K, Vougiogiannopoulou K, Aligiannis N, **Paronis E**, Gaboriaud-Kolar N, Tsitsilonis O, Skaltsounis A-L. (2017) New semi-synthetic analogs of oleuropein show improved anticancer activity in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry* 05/2017.

6. Kapogiannatou A, **Paronis E**, Paschidis K, Polissidis A, Kostomitsopoulos N. (2016) Effect of light colour temperature and intensity on the behaviour of male C57BL/6J mice. *Applied Animal Behaviour Science* 08/2016.
7. Konstantakou E, Voutsinas G, Velentzas A, Basogianni A, **Paronis E**, Balafas E, Kostomitsopoulos N, Syrigos K, Anastasiadou E, Stravopodis D. (2015) 3-BrPA eliminates human bladder cancer cells with highly oncogenic signatures via engagement of specific death programs and perturbation of multiple signaling and metabolic determinants. *Mol Cancer* 7/2015 22;14:135.
8. **Paronis E**, Samara A, Polyzos A, Spyropoulos C, Kostomitsopoulos NG. (2014) Maternal weight as an alternative determinant of the gestational day of the Wistar rat housed in IVC cages. *Laboratory Animals* 12/2014.
9. Stasinopoulou M, Mantziaras G, **Paronis E**, Balafas E, Lelovas P, Samara A, Kostomitsopoulos N. (2013) Use of Real-Time Ultrasonography as an Alternative Method for Early Detection, Confirmation and Evaluation of Rat Pregnancy. *Ultrasound in medicine & biology* 01/2014.
10. Kostomitsopoulos N, Dontas I, Alexakos P, Lelovas P, Galanos A, **Paronis E**, Balafas E, Paschidis K, Kostakis A. (2011) Growing male rats in individually ventilated and open-top cages. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 01/2011; 50(6):879-83.
11. Samara A, Vougas K, Papadopoulou A, Anastasiadou E, Baloyanni N, **Paronis E**, Chrousos GP, Tsangaris GT. (2009) Proteomics reveal rat hippocampal lateral asymmetry. *Hippocampus*. 2009 Dec 17.
12. Kostomitsopoulos NG, **Paronis E**, Alexakos P, Balafas E, van Loo P, Baumans V. (2007) The influence of the location of a nest box in an individually ventilated cage on the preference of mice to use it. *J Appl Anim Welf Sci* 10(2):111-21.
13. Kostomitsopoulos N, Donnelly H, Kostavasili I, **Paronis E**, Alexakos P, Karayannacos P. (2007) Eradication of *Helicobacter bilis* and *H. hepaticus* from infected mice by using a medicated diet. *Lab Anim (NY)* 36(5):37-40.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- Katsimpoulas M, Foteinou M, **Paronis E**, Alexakos P, Karayannacos PE. (2018) Pituitary adenoma in aged rats. A case report. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 59 (1): 58-63.
- Kostomitsopoulos NG, Balafas E, Mantziaras G, **Paronis E**, Alexakos, P, Karayannacos PE. (2006) Porcine malignant hyperthermia during sevoflurane anaesthesia. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 57 (2):122-126.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

- **E Paronis**, O Tsitsilonis, P Bouziotis, M Katsimboulas, A Prignon, C Provost, N Kadoglou, N Kostomitsopoulos, G Geloulakos, A Lazaris. Cilostazol administration negatively affects neoangiogenesis in immunodeficient mouse model of hind limb ischemia. 66th International Congress of ESCVS May 11th - 14th, 2017, Thessaloniki, Greece.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **E Paronis**, O Tsitsilonis, P Bouziotis, M Katsimboulas, A Prignon, C Provost, N Kadoglou, N Kostomitsopoulos, G Geloulakos, A Lazaris. Cilostazol administration negatively affects neoangiogenesis in immunodeficient mouse model of hind limb ischemia. 66th International Congress of ESCVS May 11th - 14th, 2017, Thessaloniki, Greece. **Oral Presentation**
- A Kapogiannatou, **E Paronis**, K Paschidis, N Kostomitsopoulos. Effect of light colour temperature and intensity on the anxiety-like behaviour of C57BL/6J mice, 45th Annual Meeting of Scand-LAS, 9-12 June 2015 Turku, Finland. **Oral Presentation**
- E Balafas, M Stasinopoulou, P Lelovas, E Symeone, P Alexakos, **E Paronis**, N. Kostomitsopoulos. An easy and “enriched” method for oestrous

synchronisation in mice. Scand-LAS Frontline research through refinement 24-27 April 2014.

- E Kutroli, E Balafas, E Symeon, C Dimitriou, **E Paronis**, P Alexakos, M Stasinopoulou, N Kostomitsopoulos. Assessment of Body Temperature in Rats Using Infrared and Rectal Temperature Probe 12th FELASA SECAL Congress Animal Research: Better Science from Fewer Animals Barcelona, 10–13 June 2013, Spain.
- M Stasinopoulou, G Mantziaras, **E Paronis**, E Balafas, K Paschidis, N Kostomitsopoulos. Using Real Time Ultrasonography for the Early Detection and Evaluation of Rat Pregnancy. 12th FELASA SECAL Congress Animal Research: Better Science from Fewer Animals Barcelona, 10–13 June 2013, Spain.
- **E Paronis**, M Stasinopoulou, A Polyzos, A Samara, N Kostomitsopoulos. Maternal weight as an alternative determinant of the gestational day of the Wistar rat housed in IVC cages. 12th FELASA SECAL Congress Animal Research: Better Science from Fewer Animals Barcelona, 10–13 June 2013, Spain.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής – Αγγειολογίας, (Θεσ/νίκη, 14-16 Μαρτίου 2019. Σύγκριση απεικονιστικών μεθόδων αγγειογένεσης κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης περιφερικής ισχαιμίας σε μοντέλο ανοσοανεπαρκούς μυός.
- 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής – Αγγειολογίας, (Θεσ/νίκη, 15-18 Μαρτίου 2018). Η σιλοσταζόλη επιδρά στο μηχανισμό έκκρισης κυτταροκινών κατά την οξεία φάση φλεγμονής, σε μοντέλα περιφερικής ισχαιμίας ανοσοανεπαρκούς και αγρίου τύπου μυός, διαφοροποιώντας την επαγόμενη αγγειογένεση.
- 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής – Αγγειολογίας, Μάρτιος 2017, Επίδραση της σιλοσταζόλης στη φλεγμονώδη

απόκριση και την επαγωγή νεογγείωσης σε μοντέλο περιφερικής ισχαιμίας ανοσοανεπαρκούς μυός.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- Η σιλοσταζόλη επιδρά στο μηχανισμό έκκρισης κυτταροκινών κατά την οξεία φάση φλεγμονής, σε μοντέλα περιφερικής ισχαιμίας ανοσοανεπαρκούς και αγρίου τύπου μυός, διαφοροποιώντας την επαγόμενη αγγειογένεση.

17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής – Αγγειολογίας, **Πρώτο Βραβείο ελεύθερης ανακοίνωσης** (Θεσ/νίκη, 15-18 Μαρτίου 2018).

- Επίδραση της σιλοσταζόλης στη φλεγμονώδη απόκριση και την επαγωγή νεογγείωσης σε μοντέλο περιφερικής ισχαιμίας ανοσοανεπαρκούς μυός.

16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής – Αγγειολογίας, Μάρτιος 2017, **Δεύτερο Βραβείο ελεύθερης ανακοίνωσης**

- Fellowship of ICLAS 2015 awarded from ICLAS ERC

Sep 2015 honor issuer ICLAS ERC and Animal Facility of the ‘Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière Pierre et Marie Curie University Paris.

- Study of immune responses, induced by novel, synthetic inhibitors of MIF: In vivo evaluation of their anti-cancer activity.

May 2011 37th Panhellenic Medical Conference, Best Basic Research Award

- An easy and “enriched” method for oestrous synchronisation in Mice

Scand - LAS Frontline research through refinement 24 - 27 April 2014, **First price for the best poster**

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΝΟΤΗΤΑ	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	xiv
SUMMARY	xvi
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Εισαγωγή	1
1.1 Αγγειογένεση	3
1.2 Οικογένεια των ιντεγκρινών και υποδοχέας ανβ3	9
1.3 Φωσφωδιεστεράσες και Αναστολείς Φωσφωδιεστερασών	13
1.3.1 Η επίδραση της cAMP στο ανοσοποιητικό σύστημα	14
1.4 Κυτταροκίνες	16
1.4.1 Ιντερλευκίνη-10 (IL-10)	20
1.4.2 Ιντερλευκίνη-2 (IL-2)	22
1.4.3 Ιντερλευκίνη-4 (IL-4)	24
1.4.4 Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)	25
1.4.5 Παράγων νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor, TNF-α)	29
1.4.6 Ιντερφερόνη - γ (IFN- γ)	32
1.5 Τύποι ανοσολογικής απόκρισης	33
1.6 Ζωικό πρότυπο	35
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2. Υλικά και Μέθοδοι	38
2.1 Σκοπός της μελέτης	38
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός	38
2.2 Χορήγηση σιλοσταζόλης	40
2.3 Εργαστηριακές συνθήκες	43
2.4 Πειραματικό πρότυπο: Κλινική αξιολόγηση της ισχαιμίας	45
2.5 Ανάλυση κυτταροκινών - Κυτταρομετρία ροής συστοιχίας σφαιριδίων (CBA)	46
2.6 Βιοχημικές Ραδιοσήμανση του NODAGA-c(RGDfK) με γάλλιο-68	47
2.7 Παθολογονατομική επεξεργασία – Μορφομετρική ανάλυση	48
2.7.1 Χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης	51
2.7.2 Ανοσοϊστοχημεία - Αντισώματα	52
2.7.3 Μορφομετρική ανάλυση	58
2.7.3.1 Μορφομετρική ανάλυση χρώσης H&E	58
2.7.3.2 Μορφομετρική ανάλυση Ανοσοϊστοχημικών Χρώσεων	58
2.8 Στατιστική ανάλυση	59
3. Αποτελέσματα	60
3.1 Κατάσταση υγείας των ζώων μετά τη χειρουργική επέμβαση	60
3.2 Βαθμολόγηση λειτουργικότητας	61
3.3 Προφίλ κυτταροκινών	62
3.4 Βιοκατανομή του ⁶⁸ Ga-NODAGA-RGDfK	67

3.5	Ιστολογική αξιολόγηση	68
	ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	95
	ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΕΡΤΟ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	101
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	102

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η αγγειογένεση είναι μια φυσιολογική διεργασία που αφορά την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία. Τα μακροφάγα και τα T κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη αυτού του φαινομένου. Αυτά τα κύτταρα συχνά επηρεάζονται από ποικίλα φάρμακα που χορηγούνται για τη θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με την παθολογική απόφραξη των αιμοφόρων αγγείων και που στοχεύουν συγκεκριμένα μόρια, όπως της οικογένειας αναστολέων της φωσφοδιεστεράσης.

Η σιλοσταζόλη είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 3A (PDE-3A), με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία της διαλείπουσας χωλότητας (IC), αυξάνοντας σημαντικά την παράταση του χρόνου βάδισης ασθενών με IC. Το φάρμακο δρα στα αιμοπετάλια, τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αυξάνοντας τα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) μέσω της παράλληλης ενδοκυτταρικής αναστολής του PDE-3A και της εξωκυτταρικής πρόσληψης αδενοσίνης.

Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο περιφερικής αρτηριακής νόσου (PAD) σε ποντικούς, σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της αγγειογένεσης στους ισχαιμούντες γαστροκνήμιους μύες μετά την επαγωγή χειρουργικής ισχαιμίας των οπίσθιων άκρων, καθώς και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της σιλοσταζόλης και των κυττάρων της φυσικής ανοσίας, και των επιδράσεων του φαρμάκου στο προφίλ των παραγόμενων κυτταροκινών.

Μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 108 NOD.CB17-Prkdcscid/J και 108 CB17 αρσενικοί ποντικοί. Όλα τα ζώα υποβλήθηκαν σε χειρουργική ισχαιμία των πίσω άκρων. Την ημέρα της χειρουργικής επέμβασης (D0) χορηγήθηκαν 60 mg/kg σιλοσταζόλης σε όλα τα ζώα και τα ποντίκια συνέχισαν να λαμβάνουν ημερήσια δόση 30 mg/kg για τις επόμενες 7 μετεγχειρητικές ημέρες. Στις ομάδες ελέγχου χορηγήθηκε καθημερινά φυσιολογικός ορός. Τις μετεγχειρητικές ημέρες D1, D3, D5, και D7, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF και IFN- γ στον ορό με κυτταρομετρία ροής. Την D7 μετά από ευθανασία των ζώων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με χορήγηση ^{68}Ga -RGD. Ο γαστροκνήμιος μύς απομονώθηκε για ιστολογική αξιολόγηση.

Βασικά ευρήματα: Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στις συγκεντρώσεις των IL-4, IL-10, IL-6 και IFN- γ στα ζώα άγριου τύπου που υποβλήθηκαν σε αγωγή με σιλοσταζόλη, ενώ η IL-2 φάνηκε να καταστέλλεται σε σημαντικό βαθμό. Στα ανοσοανεπαρκή ζώα που έλαβαν αγωγή, τα επίπεδα TNF, IL-6 και IFN- γ παρουσίασαν σημαντική αύξηση ενώ η πρόσληψη ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK και η έκφραση του υποδοχέα CD31 βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερες στο ισχαιμικό άκρο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση του υποδοχέα CD31 στα αγρίου τύπου ζώα που έλαβαν αγωγή, όχι όμως και στην πρόσληψη ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου.

Σημασία: Η σιλοσταζόλη φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα ανοσοκύτταρα ως προς τις κυτταροκίνες που παράγουν μέσω μεταβολής του τύπου της ανοσολογικής απόκρισης, προάγοντας την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών στα άγριου τύπου ζώα και βοηθώντας τη βελτίωση της ανοσολογικής απόκρισης στα ζώα με ανοσοανεπάρκεια.

Συμπεράσματα: Η σιλοσταζόλη φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα ανοσοκύτταρα επιδρώντας κυρίως στην παραγωγή κυτταροκινών, τροποποιώντας έτσι τον τύπο της ανοσολογικής απόκρισης. Επιπλέον, η σιλοσταζόλη φαίνεται να προάγει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και να αναστέλλει την παραγωγή IL-2 στα άγριου τύπου ζώα, ενώ βοηθά στη βελτίωση των ανοσολογικών αποκρίσεων στα ανοσοανεπαρκή ζώα επάγοντας την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και IFN- γ , μια διαπίστωση που πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Όσον αφορά την επίδραση της σιλοσταζόλης στην αγγειογένεση, τα αποτελέσματά μας δείχνουν μειωμένη έκφραση του υποδοχέα της ιντεγκρίνης ανβ3 και του υποδοχέα CD31 στους ανοσοανεπαρκείς ποντικούς, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση του υποδοχέα CD31 στα αγρίου τύπου ζώα που έλαβαν αγωγή, όχι όμως και στην πρόσληψη ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου.

SUMMARY

Introduction: Angiogenesis is a physiological process involving the growth of new blood vessels from pre-existing vessels, with macrophages, and T cells playing an important role in the development of this phenomenon. These cells are also affected by various drugs administered for the treatment of diseases related to the pathological obstruction of blood vessels which, initially target molecules, like the phosphodiesterase inhibitor family.

Cilostazol is a selective inhibitor of phosphodiesterase 3A (PDE-3A), with proven effectiveness in the treatment of intermittent claudication (IC), increasing the distance walked by patients with IC. The drug acts on platelets, vascular smooth muscle cells and endothelial cells by increasing the levels cyclic adenosine monophosphate (cAMP) via the concomitant intracellular PDE-3A inhibition and extracellular adenosine uptake.

Using a Peripheral Arterial Disease (PAD) mouse model, the purpose of this study was to investigate the revascularization of ischemic muscles after the induction of surgical hind limb ischemia, as well as the interactions between cilostazol and innate immunity cells, and the effects of the drug on the profile of cytokines produced.

Methods: A total of 108 NOD.CB17-Prkdcscid/J and 108 CB17 male mice were used. All animals underwent hind limb ischemia. At the day of surgery (D0), 60 mg/kg of cilostazol were administered to all animals which continued receiving a daily dosage of 30 mg/kg for the next 7 postoperative days. Vehicle was administered daily in the control groups. Serum concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN-gamma were measured by flow cytometry on post-surgery days D1, D3, D5, and D7. On D7 Post-mortem Analysis was performed after the administration of ⁶⁸Ga-RGD. The gastrocnemius muscle was obtained for histological evaluation.

Key findings: There was a statistically significant augmentation ($p < 0.05$) in the concentrations of IL-4, IL-10, IL-6 and IFN-g in cilostazol treated wild type animals while IL-2 was significantly suppressed. In treated immunodeficient animals, TNF, IL-6 and IFN-g presented significant augmentation while the uptake of ⁶⁸Ga-NODAGA-RGDfK was found significantly lower for both legs in comparison with

the control group. No significant difference in the uptake of ⁶⁸Ga-NODAGA-RGDfK was found in wild type animals.

Significance: Cilostazol seems to significantly influence immunity cells in cytokine production altering the type of immunity response by promoting the production of anti-inflammatory cytokines in wild type animals while it helps toward the improvement of immunity response in immunodeficient animals.

Conclusions: In conclusion, cilostazol seems to significantly impact on immune cells, mainly affecting cytokine production, thus altering the type of immune response; cilostazol seems to promote the production of anti-inflammatory cytokines and the suppression of IL-2 in wild-type animals, while it helps towards the improvement of immune responses in immunodeficient animals by increasing the secretion of proinflammatory cytokines and IFN- γ , an indication that needs to be further investigated. Regarding the effects of cilostazol on angiogenesis, our results indicate reduced expression of $\alpha v\beta 3$ integrin and CD31 receptor in immunodeficient mice, while cilostazol seems to significantly increase angiogenesis in wild type animals during the first post operational week.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Η περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων (Peripheral Arterial Disease, PAD) ορίζεται ως ο περιορισμός ή η διακοπή της αιμάτωσης του αρτηριακού δένδρου που τροφοδοτεί τα κάτω άκρα λόγω απόφραξης του αυλού των αγγείων ^{1,2,3}. Η αθηρωμάτωση των περιφερικών αρτηριών αναγνωρίζεται ως κύριο αίτιο της νόσου. Η πλειοψηφία των ασθενών υφίσταται σημαντικές αλλαγές στον τρόπο ζωής τους, που οδηγούν έως και στην απώλεια της εργασίας τους ή χειρότερα στην αναπηρία. Η PAD εκτιμάται ότι προσβάλλει 7,4 εκατομμύρια άτομα ηλικίας άνω των 60 στις Ηνωμένες Πολιτείες ⁴. Η επίπτωση της PAD αυξάνει με την ηλικία και κυμαίνεται από 1% σε ηλικία <50 ετών έως και >10% σε ηλικία >70 ετών ^{1,2,3}.

Η ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα, η υπερλιπιδαιμία, η υπέρταση και ο διαβήτης είναι οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση PAD, η οποία είναι συνήθως κλινικά «σιωπηρή» στα αρχικά στάδια εξέλιξής της. Στη συνέχεια, όταν ο βαθμός αρτηριακής στένωσης είναι >50% ³, εκδηλώνεται με IC, δηλ. διαλείπον άλγος κυρίως στους γαστροκνήμιους μύες που εντείνεται με την κόπωση και υφίεται με τη χαλάρωση των μυών. Η φυσική πορεία της νόσου είναι σταδιακή επιδείνωση της ισχαιμίας με μετάπτωση σε κρίσιμη ισχαιμία του άκρου (άλγος ηρεμίας ή/και γάγγραινα) και τελικά ακρωτηριασμό του απειλούμενου σκέλους. Παρά το γεγονός ότι το 50% των ασθενών με PAD είναι ασυμπτωματικό, έως και το ένα τρίτο περίπου θα εκδηλώσει συμπτώματα IC ^{1,2,3}.

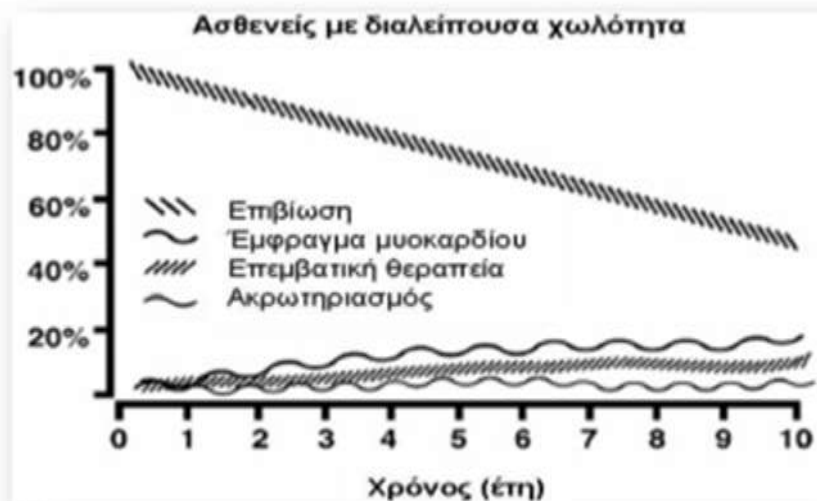
Ένα ποσοστό 5-10% των ασθενών με PAD θα μεταπέσει σε κρίσιμη ισχαιμία (άλγος ηρεμίας ή/και γάγγραινα) με τελικό ακρωτηριασμό του άκρου έως και στο 40% των περιπτώσεων και θνησιμότητα έως και 25% ετησίως ^{1,3}. Η χρόνια κρίσιμη ισχαιμία των κάτω άκρων (Critical Limb ischemia; CLI) ορίζεται ως το άλγος ηρεμίας που απαιτεί τακτική αναλγησία ή μη ιάσιμο έλκος ή γάγγραινα των κάτω άκρων που οφείλεται σε αποδεδειγμένη αρτηριακή αποφρακτική νόσο ². Η CLI έχει ετήσια επίπτωση 400-1000/1,000,000 πληθυσμού και συνοδεύεται από ~45% θνησιμότητα από καρδιαγγειακά αίτια εντός 5 ετών ^{2,5,6,7}.

Οι ασθενείς με CLI είναι κατά κανόνα υψηλού εγχειρητικού κινδύνου (με συννοσηρότητες όπως διαβήτης, ισχαιμική καρδιοπάθεια, κ.α.), ενώ συχνά δεν διαθέτουν αυτόλογο φλεβικό μόσχευμα ή το κατάλληλο αγγείο απορροής ώστε να υποβληθούν σε επιτυχή επαναγγείωση με χειρουργική παράκαμψη (bypass).

Χωρίς άμεση επαναγγείωση, η CLI συνοδεύεται από πολύ υψηλό κίνδυνο ακρωτηριασμού. Ο Wolfe και συνεργάτες περιέγραψαν τη φυσική πορεία της νόσου και τη φτωχή πρόγνωση που την χαρακτηρίζει σε περισσότερους από 6000 ασθενείς (Εικ. 1). Χωρίς καμία θεραπευτική αγωγή, μείζων ακρωτηριασμός απαιτήθηκε στο 73% των ασθενών με άλγος ηρεμίας και στο 95% των ασθενών με τροφικά έλκη και απώλεια δέρματος ή του υποκείμενου ιστού εντός τους 1^{ου} έτους.

Περισσότεροι από 100 γνωστοί φυσιολογικοί παράγοντες εμπλέκονται στις βλάβες του μηχανισμού επούλωσης των ισχαιμικών ελκών των άκρων που εκδηλώνονται σε διαβητικούς ασθενείς. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η μειωμένη παραγωγή αυξητικών παραγόντων, η μειωμένη αγγειογενετική απόκριση, η δυσλειτουργία των μακροφάγων, η μειωμένη συγκέντρωση κολλαγόνου και κερατινοκυττάρων, ο περιορισμένος πολλαπλασιασμός και μετανάστευση των ινοβλαστών, και η μειωμένη επούλωση των ιστών.

Η χορήγηση αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων για ενίσχυση του σχηματισμού παράπλευρου δικτύου αρτηριδίων θεωρείται πλέον η βέλτιστη οδός αντιμετώπισης της ισχαιμικής νόσου, αν και δεν υπάρχει ακόμα αποτελεσματική φαρμακευτική αγωγή για ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία του κάτω άκρου.

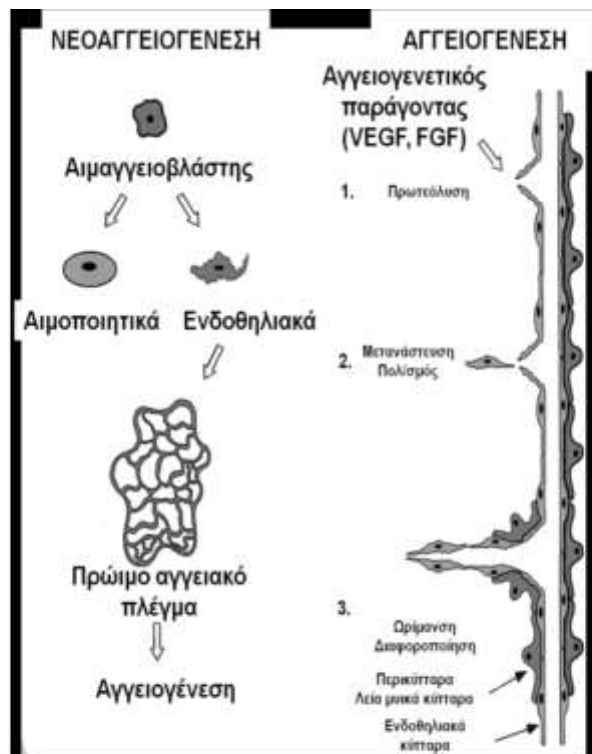


Εικόνα 1. Διαγραμματική απεικόνιση της νοσηρότητας και θνησιμότητας των ασθενών με συμπτωματική περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια από τη στιγμή της εμφάνισης των συμπτωμάτων διαλείπουσας χωλότητας ^{1,2}.

1.1 Αγγειογένεση

Ο ακριβής ορισμός της αγγειογένεσης είναι η δημιουργία αιμοφόρων αγγείων από ήδη υπάρχοντα ⁸. Η αγγειογένεση είναι μια πολύ βασική διαδικασία τόσο για την ανάπτυξη, όσο και για τη σωστά δομημένη φυσιολογία του ενήλικου οργανισμού μέσω της δημιουργίας ενός κλειστού κυκλοφορικού συστήματος για την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στους διαφόρους ιστούς ⁹. Το αγγειακό σύστημα αναπτύσσεται αμέσως μετά τη διαδικασία της γαστρίδωσης. Ο σχηματισμός του εμβρυϊκού αγγειακού συστήματος ξεκινά από προγονικά κύτταρα, τους αιμαγγειοβλάστες οι οποίοι διαφοροποιούνται είτε σε αιμοποιητικά είτε σε ενδοθηλιακά κύτταρα και με αυτή τη διαφοροποίηση δημιουργούνται τα πρώτα αγγεία, μια διαδικασία που ονομάζεται νεοαγγειογένεση ⁹ (Εικ. 2). Στη συνέχεια, παράγονται νέα αγγεία με εκβλάστηση ή μη από τα ήδη υπάρχοντα και μετά από κατάλληλες διαδικασίες αναδιαμόρφωσης, συνδέονται, ώστε τελικά να δημιουργήσουν ένα λειτουργικό αγγειακό δίκτυο στους ενήλικες. Τα αγγεία φαίνεται να διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των οργάνων στο έμβρυο και στην επούλωση των τραυματισμένων ιστών στον ενήλικα ⁹. Τα αιμοφόρα αγγεία μεταφέρουν οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και όλα εκείνα τα σήματα που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση των φυσιολογικών λειτουργιών των ιστών αλλά και των

οργάνων. Τα μεγάλα αγγεία εκτός των ενδοθηλιακών κυττάρων που φέρουν, σταθεροποιούνται και πλαισιώνονται από περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα (υποστηρικτικά κύτταρα), ενώ τα μικρά αγγεία αποτελούνται μόνο από ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι τρεις παραπάνω τύποι κυττάρων εκφράζουν όλες τις απαραίτητες πρωτεΐνες και μόρια που στοχεύουν στη σωστή δημιουργία αυλών και διακλαδώσεων του αγγειακού δικτύου. Κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης απαιτείται συντονισμός στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ύλης, στον πολλαπλασιασμό και στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ουσιαστικά λαμβάνουν χώρα οι εξής διαδικασίες: η δημιουργία των αγγείων, η σταθεροποίησή τους, η επακόλουθη διακλάδωσή τους, η ανάπλαση αυτών, το «κλάδεμα» τους και η εξειδίκευση τους, διαδικασίες που επιτρέπουν ώστε η δημιουργία των αγγείων να εξελίσσεται συγχρόνως με την ωρίμανση τους⁹.



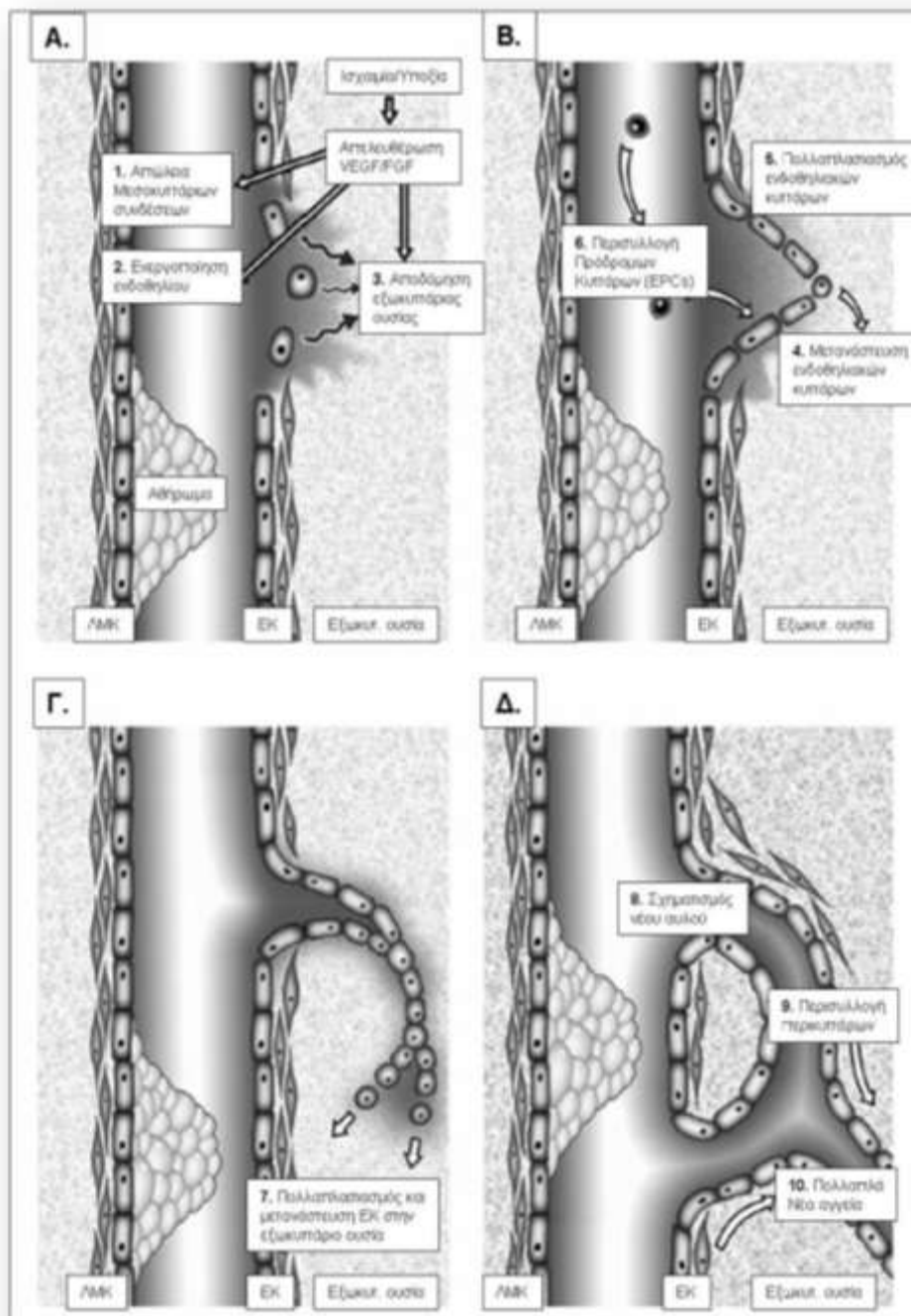
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της νεοαγγειογένεσης, του πρώιμου αγγειακού δικτύου και της αγγειογένεσης, δηλαδή του σχηματισμού νέων αγγείων από προϋπάρχοντα. Στη νεοαγγειογένεση αρχέγονα αγγειοβλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στα πρώιμα όργανα τα οποία χαρακτηρίζονται ως νησίδες αίματος, αναπτύσσονται σε αιμοποιητικά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα θα σχηματίσουν το πρώιμο αγγειακό πλέγμα, το οποίο αναπτύσσεται και διαφοροποιείται περαιτέρω προκειμένου να σχηματίσει το ώριμο αγγειακό σύστημα. Η αγγειογένεση μπορεί να διακριθεί σε μία σειρά από διακριτές διαδικασίες (πρωτεύουσα, μετανάστευση, πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση) ⁶². (Gerwins et al. 2000)

Την ωρίμανση των αγγείων επηρεάζουν διάφορες αλλαγές στο μικροπεριβάλλον τους, όπως η παρουσία υποξίας, οι χαμηλές τιμές pH, καθώς και το μηχανικό στρες, ερεθίσματα στα οποία ανταποκρίνονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα με το να πολλαπλασιάζονται άμεσα. Στις καταστάσεις όπου διαταράσσεται η φυσιολογική ισορροπία ανάμεσα στους παράγοντες που σχετίζονται με την επαγωγή (αγγειογενετικοί) ή μη (αντιαγγειογενετικοί) της αγγειογένεσης, παρατηρείται είτε ανεπαρκής ανάπτυξη αγγείων είτε παθολογικά αυξημένη αγγειογένεση που σχετίζονται με πληθώρα ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η ψωρίαση, η αρθρίτιδα και η τύφλωση ⁹.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες γίνονται εντατικές προσπάθειες μελέτης της αγγειογένεσης σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Μελέτες σε οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δείξει ότι η διαδικασία του σχηματισμού νέων αγγείων συμβαίνει ακολουθώντας μία συγκεκριμένη αλληλουχία σταδίων. Τα στάδια αυτά είναι πάντα τα ίδια και είναι ανεξάρτητα από την προέλευση των ερεθισμάτων που τα προκαλούν ^{10,11}. Μπορούν να συνοψισθούν ως εξής: (1) τα ενδοθηλιακά

κύτταρα προϋπαρχόντων μικροαγγείων, που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, διεγείρονται από κάποιο αγγειογενετικό ερέθισμα και αποδομούν τη βασική τους μεμβράνη ^{12,13,14,15}, (2) δημιουργείται αύξηση του αριθμού των οργανιδίων των κυττάρων, δημιουργούνται ψευδοπόδια, και τα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να μεταναστεύουν στο υποκείμενο εξωκυττάριο στρώμα προς το αγγειογενετικό ερέθισμα ¹⁶, (3) τα κύτταρα διαφοροποιούνται πάλι σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα και συντάσσονται ανάλογα, ώστε να σχηματίσουν τους αυλούς των νέων αγγείων, (4) περικύτταρα μεταναστεύουν κατά μήκος του νεοσχηματισθέντος αγγείου και δημιουργούν την εξωτερική επιφάνεια του αγγείου, και (5) σχηματίζεται η βασική μεμβράνη από τα ενδοθηλιακά κύτταρα με τη συμμετοχή και των περικυττάρων ^{17,18,19,20,21}. Αυτά τα νέα τριχοειδή αγγεία είναι δυνατόν να προκαλέσουν το σχηματισμό νέων εκβλαστήσεων (sprouts), και να δημιουργήσουν τελικά ένα ολόκληρο τριχοειδικό πλέγμα. Τα νεοσχηματιζόμενα τριχοειδή αγγεία επιμηκύνονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα άκρα τους, καθώς επίσης και με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στο μέσο της τριχοειδικής διακλάδωσης. Έτσι σχηματίζεται πρώτα ο σκελετός του νέου τριχοειδούς και στη συνέχεια ο νέος αυλός.

Οι νέες διακλαδώσεις αναστομώνονται μεταξύ τους και δημιουργούνται νέα τριχοειδή μέσα από τα οποία αρχίζει η ροή του αίματος ^{22,23,24,25}. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πεπλατυσμένα πολυγωνικά κύτταρα μήκους 25-50 μm και πλάτους 10-15 μm. Είναι κύτταρα πολύ λεπτά στα άκρα, αλλά το πάχος τους φθάνει τα 3 μm στην περιοχή του πυρήνα. Σχηματίζουν ένα μονοκυτταρικό στρώμα στο εσωτερικό των αιμοφόρων αγγείων και έχουν τον κατά μήκος άξονά τους προσανατολισμένο κατά τη φορά της ροής του αίματος (Εικ. 3).



Εικόνα 3. Σχηματική περιγραφή των διαφόρων σταδίων (1-10) σχηματισμού νέων αγγείων με τη διαδικασία της αγγειογένεσης (ΛΜΚ: Λεία μυϊκά κύτταρα, ΕΚ: Ενδοθηλιακά κύτταρα)

Στην καθημερινή κλινική πράξη, ορισμένοι ασθενείς με περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια, όπως προαναφέρθηκε παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα ή παραμένουν πλήρως ασυμπτωματικοί, αν και υπάρχει σημαντική στένωση ή ακόμα και πλήρης απόφραξη ενός κεντρικού τροφοφόρου αγγείου, π.χ. της λαγονίου ή/και της μηριαίας αρτηρίας. Αυτό παρατηρείται κυρίως σε ασθενείς με αποφράξεις αρτηριών που

εξελίσσονται αργά, οπότε υπάρχει αρκετός χρόνος για την ανάπτυξη ενδογενούς παράπλευρης κυκλοφορίας, η οποία παρακάμπτει το σημείο της στένωσης ή της απόφραξης. Ωστόσο, στις περιπτώσεις που η αποφρακτική αγγειακή βλάβη εξελίσσεται πολύ γρήγορα, η παράπλευρη κυκλοφορία αναπτύσσεται πολύ αργά και εξακολουθεί να είναι ανεπαρκής για να αντισταθμίσει την αιματική άρδευση των άπω ιστών και να τους προστατεύσει από ισχαιμική βλάβη. Σε πολλούς ασθενείς με προχωρημένη αθηρωμάτωση και πολυεπίπεδη αποφρακτική αγγειοπάθεια δεν είναι εφικτή ούτε η διαδερμική ενδαγγειακή αντιμετώπιση με αγγειοπλαστική και μεταλλικές ενδοπροσθέσεις (stents), ούτε η χειρουργική επαναγγείωση του ισχαιμούντος ιστού μέσω αρτηριακής παράκαμψης (bypass)^{26,27,28}. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η εξωγενής θεραπευτική διέγερση και επιτάχυνση αυτού του φυσιολογικού προστατευτικού μηχανισμού ανάπτυξης παράπλευρων αρτηριών²⁹ – η οποία ονομάζεται «αρτηριογένεση» - μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση για τη βελτίωση και αποκατάσταση της παροχής αίματος σε ισχαιμούντες ιστούς.

Πράγματι, πολλές φαρμακολογικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την τόνωση της ανάπτυξης των παράπλευρων αρτηριών βασίζονται κυρίως στις γνώσεις που αποκτήθηκαν από τη μελέτη της παθολογικής αγγειογένεσης³⁰. Έτσι η σύγχρονη έρευνα για τα καρδιαγγειακά νοσήματα έχει εστιάσει την προσοχή της σε νέους ελάχιστα επεμβατικούς τρόπους επαναιμάτωσης, όπως είναι η θεραπευτική αγγειογένεση³¹ με ενδοαρτηριακή, ενδομυϊκή ή περιαγγειακή έγχυση διαφόρων αγγειογενετικών παραγόντων οι οποίοι διεγείρουν τα ενδογενή αγγειογενετικά βιοχημικά μονοπάτια και προάγουν την ανάπτυξη παράπλευρου δικτύου ικανού να αναστρέψει την ιστική ισχαιμία και υποξία^{32,33,34}.

Οι δοκιμαζόμενοι παράγοντες για την επαγωγή θεραπευτικής αγγειογένεσης διακρίνονται σε 3 κατηγορίες:

- 1) Πρωτεϊνικά μόρια (protein-based therapy)³⁵.
- 2) Γονιδιακή θεραπεία (gene-based therapy).
- 3) Χορήγηση/έγχυση κυττάρων (cell-based therapy).

Συγκεκριμένα, τα ανασυνδυασμένα πρωτεϊνικά μόρια χορηγούνται εξωγενώς σε συγκεκριμένη δοσολογία και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες ιδιότητες. Σε περίπτωση παρενεργειών, το δοσολογικό σχήμα αναπροσαρμόζεται ανάλογα με το χρόνο ημίσειας ζωής του μορίου.

Αντιθέτως, η γονιδιακή προσέγγιση, που έχει δοκιμαστεί ευρέως σε πειραματικά μοντέλα στεφανιαίας νόσου και περιφερικής αγγειοπάθειας, βασίζεται είτε στην ενσωμάτωση του γονιδίου του αυξητικού παράγοντα σε ένα ιικό γονιδίωμα, είτε στην απευθείας χορήγηση του γονιδιακού DNA υπό μορφή πλασμιδίου ³⁶. Η χρησιμοποίηση ιικών φορέων επιτυγχάνει υψηλότερα ποσοστά διαμόλυνσης (transfection) των ιστών-στόχων από το γυμνό (naked) DNA, αλλά μπορεί να προκαλέσει κάποιας μορφής ανοσολογική απόκριση στο δέκτη και το ποσοστό ιικής διαμόλυνσης των σκελετικών μυών παραμένει σχετικά χαμηλό ^{37,38,39}. Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να επιτύχει συνεχόμενη υπερέκφραση και παραγωγή αυξητικών ουσιών στα κύτταρα δέκτες.

Οι κυτταρικές θεραπείες με τη χορήγηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs) ή άλλων προγονικών κυττάρων [εμβρυικών (embryonic) ή άλλων βλαστικών κυττάρων [stem cells]], αποτελούν νεότερες στρατηγικές για την επαγωγή θεραπευτικής αγγειογένεσης ^{40,41}.

Ως προς την οδό χορήγησης των αγγειογενετικών ουσιών, αυτή μπορεί να είναι ενδοαρτηριακή, περιαγγειακή ή ενδομυϊκή. Η ενδοαρτηριακή οδός χορήγησης είναι η πλέον επεμβατική και μπορεί να συνοδεύεται και από συστηματική διασπορά του χορηγούμενου παράγοντα. Η περιαγγειακή χορήγηση με ειδικούς καθετήρες επιτρέπει την τοπική έγχυση της εκάστοτε ουσίας κοντά στο αποφραγμένο αγγείο, επιτυγχάνοντας έως και 40 φορές υψηλότερη συγκέντρωση τοπικά σε σύγκριση με την ενδοφλέβια χορήγηση ⁴². Η ενδομυϊκή χορήγηση με πολλαπλές ενέσεις παραμένει η πιο διαδεδομένη μέθοδος θεραπευτικής αγγειογένεσης ⁴³.

Όλες αυτές οι στρατηγικές έχουν δοκιμαστεί στην προκλινική έρευνα για επαγωγή θεραπευτικής αγγειογένεσης και ενίσχυση του παράπλευρου αρτηριδιακού δικτύου στο μυοκάρδιο και σε σκελετικούς γραμμωτούς μύες ^{44,45}, αλλά τα αποτελέσματα αντίστοιχων κλινικών μελετών σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο ή περιφερική αγγειοπάθεια παραμένουν αντικρουόμενα ⁴⁶.

1.2 Οικογένεια των ιντεγκρινών και υποδοχέας της $\alpha_v\beta_3$

Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια ετεροδιμερών διαμεμβρανικών υποδοχέων που εντοπίζονται σε πολλά είδη ζώων, από τα σφουγγάρια μέχρι και τα θηλαστικά. Αποτελούνται από μία α και μία β υπομονάδα και σκοπός της λειτουργίας τους είναι να ρυθμίζουν την πρόσδεση του κυττάρου σε μόρια της εξωκυττάριας ύλης

και παράλληλα να αλληλεπιδρούν με διαλυτούς προσδέτες ή προσδέτες της κυτταρικής μεμβράνης. Η σύνδεση των δύο αλυσίδων γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου τελικά επιτυγχάνεται η δημιουργία ενός λειτουργικού ετεροδιμερούς, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη ⁴⁷.

Υπάρχουν τουλάχιστον 18 διαφορετικές α και 8 β αλυσίδες, και από αυτές προκύπτουν 24 διαφορετικοί α/β συνδυασμοί, με το κάθε ετεροδιμερές α/β να έχει τους δικούς του προσδέτες και τη δική του εξειδίκευση. Οι περισσότερες ιντεγκρίνες αναγνωρίζουν διάφορες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ύλης και αντιστρόφως, μεμονωμένες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, όπως η ιννεκτίνη, η λαμινίνη και το κολλαγόνο, δεσμεύονται σε διάφορες ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση, και ο συνολικός αριθμός ιντεγκρινών που εντοπίζονται σε ένα κύτταρο είναι αυτός που καθορίζει τη βιολογική απόκριση του κυττάρου σε ερεθίσματα από την εξωκυττάρια ύλη και το μικροπεριβάλλον ⁴⁸.

Τα εξωκυτταρικά τμήματα των δύο υπομονάδων είναι σχετικά μεγάλα και αποτελούνται περίπου από 700-1000 αμινοξέα, σε σχέση με τις μικρές κυτταροπλασματικές περιοχές που αποτελούνται από 20-50 αμινοξέα. Οι ιντεγκρίνες εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν έχουν οι ίδιες δραστηριότητες κινάσης, συμβάλλουν στην κυτταρική σηματοδότηση με τη στρατολόγηση, μέσω των κυτταροπλασματικών τους περιοχών, σηματοδοτικών μορίων όπως η FAK ⁴⁹, η c-Src ⁵⁰, η PI3K ⁵¹, καθώς και πλήθος πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού.

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται 10 διαφορετικές ιντεγκρίνες από τις οποίες οι πιο σημαντικές στα μη αγγειογενετικά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι οι $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 6\beta 1$ και $\alpha \nu \beta 5$. Είναι πολύ πιθανό να εκφράζεται και η $\alpha \nu \beta 1$, εφόσον και οι δύο αλυσίδες $\alpha \nu$ και $\beta 1$ εκφράζονται επαρκώς. Οι ιντεγκρίνες αυτές αποτελούν υποδοχείς για βασικά συστατικά της εξωκυττάριας ύλης όπως είναι το κολλαγόνο και η λαμινίνη, με εξαίρεση τις ιντεγκρίνες $\alpha \nu \beta 5$ και $\alpha 5\beta 1$, οι οποίες δεσμεύουν προσωρινά προσδέτες, όπως η βιτρονεκτίνη και η ιννεκτίνη. Κατά την αγγειογένεση, πραγματοποιείται αναδιάταξη της προσωρινής εξωκυττάριας ύλης με επιπλέον προσδέτες για τις ιντεγκρίνες $\alpha \nu \beta 5$ και $\alpha 5\beta 1$, όπως και νέες ιντεγκρίνες (π.χ. $\alpha \nu \beta 3$), που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων ⁵².

Το μοτίβο δράσης των ιντεγκρινών ως προς τους προσδέτες τους ρυθμίζεται αυστηρά από τη δομή τους και από τη μεταγωγή σήματος κυτταροπλασματικά στο ίδιο το κύτταρο, μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται ως «μέσα προς τα έξω» σηματοδότηση. Έχει βρεθεί πως κάποιοι υποδοχείς μπορούν και ενεργοποιούν τις ιντεγκρίνες

ενδοκυτταρικά, φωσφορυλιώνοντας την κυτταροπλασματική περιοχή των β υπομονάδων τους. Απαραίτητη είναι η αλληλεπίδραση των κυτταροπλασματικών περιοχών ανάμεσα στην υπομονάδα α και β προκειμένου η ιντεγκρίνη να βρίσκεται σε ανενεργό κατάσταση. Προφανώς λαμβάνει χώρα και η αντίθετη διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται ως «έξω προς τα μέσα» σηματοδότηση, όπου οι ιντεγκρίνες με τη δέσμευση διαφόρων εξωκυτταρικών προσδετών συσσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη και σηματοδοτούν προς το εσωτερικό του κυττάρου. Στο κυτταροπλασματικό τμήμα των ιντεγκρινών, προσδένονται και άλλες πρωτεΐνες, όπως η ταλίνη, η βινκουλίνη, η εξρίνη, η ραντιξίνη και η μοεξίνη, οι οποίες προσδένονται επίσης και στην ακτίνη και ενώνουν τις ιντεγκρίνες με τον κυτταροσκελετό, δημιουργώντας έτσι μεγάλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα ⁵³.

Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ελέγχεται και τροποποιείται από τις ιντεγκρίνες, οι οποίες ρυθμίζουν και την προσκόλλησή τους στην εξωκυττάρια ύλη. Η ενεργοποίηση των ιντεγκρινών θεωρείται απαραίτητη για την έναρξη και τη ρύθμιση της σηματοδότησης κατά την αγγειογένεση ⁵⁴, ενώ επιτρέπει τη λειτουργική σύνδεση των εστιών προσκόλλησης με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης ⁵⁵, ένα βήμα αρκετά σημαντικό για τον αποτακτισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ⁵⁶.

Η ανβ3 είναι μία από τις πιο καλά μελετημένες ιντεγκρίνες που έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται κατά την αγγειογένεση και να διαδραματίζει βασικό ρόλο στη ρύθμισή της. Κατά την εμβρυογένεση εκφράζεται σε διαφορετικά είδη κυττάρων, ωστόσο στον ενήλικα, η έκφρασή της περιορίζεται σε αγγειογενετικά ενδοθηλιακά, λεία μυϊκά και μερικούς πληθυσμούς αιματοποιητικών κυττάρων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμισή της είναι οι Hox D3 ⁵⁷ και Snail ⁵⁸.

Η δράση της ανβ3 σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα έχει δώσει αντιφατικά αποτελέσματα. Αναστολή της δράσης της με μικρά μόρια ή αντισώματα οδήγησε σε αναστολή της νεοαγγειογένεσης ⁵⁹, ενώ αποσιώπηση μόνο του γονιδίου της β3 οδήγησε σε αυξημένη καρκινογένεση και αγγειογένεση ⁶⁰, αυξημένη επούλωση πληγών ⁶¹ και αυξημένη φλεγμονή και αθηροσκλήρωση ⁶², κάτι που σίγουρα υποδεικνύει τη σημασία της ανβ3 στο μηχανισμό αυτών των διαδικασιών. Η αυξημένη έκφραση της ανβ3 σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, οδήγησε αρχικά στην υπόθεση ότι εμπλέκεται στην παθολογική αγγειογένεση ^{63,64}. Η αναστολή της έκφρασης της υπομονάδας αν, δεν φαίνεται να επηρεάζει την αγγειογένεση κατά την ανάπτυξη ⁶⁵. Παρόμοιο μοτίβο παρατηρείται και σε επίμυες που δεν εκφράζουν την υπομονάδα β3, οι οποίοι εμφανίζουν

φυσιολογικό αγγειακό δίκτυο, χωρίς να επηρεάζεται η αγγειογένεση κατά την ανάπτυξη ⁶⁶. Υπάρχουν ωστόσο και δεδομένα που δείχνουν ότι σε επίμυες που δεν εκφράζουν την υπομονάδα β3 επάγεται παθολογική αγγειογένεση ⁶⁷. Και τα δύο αυτά αντιφατικά αποτελέσματα καταδεικνύουν την αναγκαιότητα ρύθμισης της αγγειογένεσης από τη β3 υπομονάδα. Για να διερευνηθεί σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια η σημασία και ο ρόλος της υπομονάδας β3, χρησιμοποιήθηκαν επίμυες οι οποίοι εξέφραζαν τη μεταλλαγμένη β3, καθώς οι τυροσίνες στις θέσεις 747 και 759 (αντίστοιχες των 773 και 785 στον άνθρωπο) είχαν αντικατασταθεί από φαινυλαλανίνες, και οι ερευνητές παρατήρησαν ότι αν και οι επίμυες ήταν βιώσιμοι και γόνιμοι, παρουσίαζαν μειωμένη ανάπτυξη όγκων και παθολογική αγγειογένεση, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι τυροσίνες στις θέσεις 747 και 759 της ιντεγκρίνης β3 είναι καθοριστικές για την επαγωγή της παθολογικής αγγειογένεσης μέσω της φωσφορυλίωσής τους ⁶⁸. Η ιντεγκρίνη α_vβ₃ μπορεί να έχει είτε θετικό είτε αρνητικό ρόλο κατά την αγγειογένεση, με τη δράση της να καθορίζεται κάθε φορά από τους προσδέτες της και το μικροπεριβάλλον ⁶⁹. Ο σημαντικός ρόλος της ιντεγκρίνης ανβ3 στην αγγειογένεση φαίνεται και από το γεγονός ότι δεσμεύεται σε αρκετούς αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως στον VEGFR-2, στη βιτρονεκτίνη, στην ινονεκτίνη, στη θρομβίνη και στην PTN, καθώς και σε αρκετούς αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως στη θρομβοσπονδίνη, στην αγγειοστατίνη και στην τουμοστατίνη ^{70,71}. Ο αντιφατικός ρόλος της α_vβ₃ στην αγγειογένεση μπορεί να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι η έκφραση και η λειτουργικότητα μιας ιντεγκρίνης μπορεί να επηρεάσει άλλες ιντεγκρίνες ⁷². Η ενεργοποίηση της υπομονάδας β1 των ιντεγκρινών α3β1 και α6β1, αναστέλλει τη λειτουργικότητα της ανβ3 στην προσκόλληση των κυττάρων ⁷³, παρόλο που αυτό δεν επιβεβαιώθηκε στην περίπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων όπου είχε ανασταλεί η έκφραση της β3. Ωστόσο, η αυξημένη παθολογική αγγειογένεση σε επίμυες που δεν εκφράζουν τη β3, μπορεί να εξηγηθεί λόγω αυξημένης έκφρασης και λειτουργίας του VEGFR-2 ^{74,75}.

Επίσης, η ιντεγκρίνη ανβ3 φαίνεται να εμπλέκεται στη δημιουργία των υπερτροφικών ουλών, μια κατάσταση που σχετίζεται με την υπερβολική εναπόθεση κολλαγόνου, επάγοντας την εκτεταμένη διαφοροποίηση των ινοβλαστών και τη σύνθεση του κολλαγόνου, καθώς έχει δειχθεί πως η έκφρασή της σε ιστούς από τέτοιου τύπου ουλές είναι αυξημένη σε σχέση με τους φυσιολογικούς, γεγονός που υποδηλώνει πως η στόχευσή της ίσως μπορέσει να αποτελέσει αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση αυτών των υπερτροφικών ουλών ⁷⁶. Έχει βρεθεί ακόμα πως η α_vβ₃

σχετίζεται με την αυξημένη παραγωγή βοηθητικών T κυττάρων και την επαγόμενη παραγωγή των κυτταροκινών IL-2 και IL-10 κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε ποντικούς, κάτι που αντιστρέφεται παρουσία ενός αναστολέα της ⁷⁷.

Υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν την $\alpha_v\beta_3$ να αλληλεπιδρά με τον PDGF και με τον VEGFR-2, ρυθμίζοντας τη δραστηριότητά τους ^{78,79}. Αν και η ενδοκυτταρική σηματοδότηση από τις ιντεγκρίνες είναι αρκετά περίπλοκη και δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα που να την αποσαφηνίζουν, ένα μόριο που θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή την μεταγωγή σήματος είναι η κινάση FAK, η οποία μεσολαβεί οποιαδήποτε σηματοδότηση προέρχεται από τις ιντεγκρίνες, τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) και του PDGF⁸⁰. Η ίδια κινάση πιστεύεται πως χρησιμεύει ως σημείο σύγκλισης για τους VEGFR-2 και $\alpha_v\beta_3$, ρυθμίζοντας φυσιολογικά τη συγκρότηση των εστιών προσκόλλησης, απαραίτητο βήμα για τον πολυμερισμό της ακτίνης και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Άλλωστε όπως αποδείχθηκε σε μελέτες, η ενεργοποίηση του VEGFR-2 οδηγεί σε φωσφορυλίωση της FAK στη Ser732 και αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής της, καθιστώντας έτσι εύκολη τη φωσφορυλίωση της Tyr407 από την Pyk2, που με τη σειρά της ενεργοποιείται από τη β_3 υπομονάδα ⁸¹.

1.3 Φωσφοδιεστεράσες και Αναστολείς Φωσφοδιεστερασών

Οι φωσφοδιεστεράσες (PDEs) αποτελούν ομάδα ενζύμων που δρουν απενεργοποιώντας το κυκλικό νουκλεοτίδιο cAMP με υδρόλυση του 3'-φωσφοδιεστερικού δεσμού που περιέχει, μετατρέποντάς το στο μη ενεργό 5'-μονοφωσφορικό νουκλεοτίδιο. Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί περισσότερες από 14 οικογένειες PDEs, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τους αραβικούς αριθμούς 1 έως 14 (PDE1-14), κωδικοποιούνται από 25 γονίδια στα θηλαστικά, αποτελούνται από περισσότερα από 50 ισομερή και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την αλληλουχία, την ειδικότητα του υποστρώματος, τον απαιτούμενο συμπαράγοντα δράσης και την αναστολή από ποικίλους παράγοντες ^{82,83}.

Η σιλοσταζόλη (cilostazol) είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης τύπου 3 (PDE3), με θεραπευτική δραστηριότητα στην αύξηση του cAMP. Η συνολική δράση της γενικά συνίσταται στην αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του cAMP, γεγονός που επιδρά στις λειτουργίες ποικίλων κυττάρων που συμμετέχουν

στην ανοσιακή απόκριση, όπως τα επιθηλιακά, δένδριτικά, ηωσινόφιλα, μακροφάγα, μαστοκύτταρα, μονοκύτταρα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα, T και B λεμφοκύτταρα.

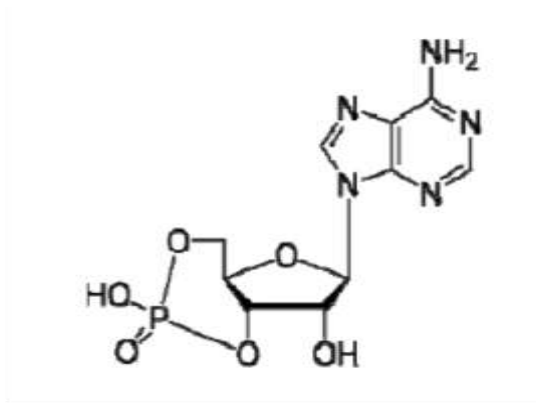
Η αύξηση του cAMP οδηγεί σε αύξηση της ενεργούς μορφής της πρωτεϊνικής κινάσης A, η οποία συνδέεται άμεσα με αναστολή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. Η πρωτεϊνική κινάση A εμποδίζει επίσης την ενεργοποίηση ενός ενζύμου (της κινάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης), που είναι σημαντική για τη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων, ασκώντας έτσι την αγγειοδιασταλτική δράση της.

Η σιλοσταζόλη βελτιώνει τα συμπτώματα της IC έχοντας αντιαιμοπεταλιακή και αγγειοδιασταλτική δράση, και αυξάνει τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στον ορό μειώνοντας ταυτόχρονα τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο αίμα ⁸⁴. Η σιλοσταζόλη ενδείκνυται για τη βελτίωση των μέγιστων και ελεύθερων πόνου αποστάσεων βάδισης σε ασθενείς με IC, οι οποίοι δεν εμφανίζουν πόνο ανάπαυσης/ηρεμίας και δεν έχουν ένδειξη περιφερικής ιστικής νέκρωσης (περιφερική αρτηριακή νόσος Fontaine σταδίου II).

Σε συγκριτική μελέτη δύο ομάδων ασθενών που ελάμβαναν σιλοσταζόλη και πεντοξυφιλίνη, ο Dawson και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η ομάδα ασθενών υπό θεραπεία με σιλοσταζόλη είχαν βελτιωμένη ικανότητα βάδισης τόσο στην συνολική απόσταση βάδισης όσο και στη βάδιση χωρίς συμπτώματα πόνου ⁸⁵. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξε και μία μετα-ανάλυση οκτώ διπλά τυφλών μελετών που σύγκριναν την σιλοσταζόλη με εικονικό φάρμακο (placebo) ⁸⁴.

1.3.1 Η επίδραση του cAMP στο ανοσοποιητικό σύστημα

Το κυκλικό νουκλεοτίδιο AMP (cAMP, 3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, Εικ. 4) όπως περιληπτικά προαναφέρθηκε, αποτελεί τον πρώτο δευτερογενή αγγελιοφόρο που ανακαλύφθηκε το 1957, από τον Νομπελίστα για τις ανακαλύψεις του στον τομέα των ορμονών (1971), Δρ. Earl W. Sutherland ^{86,87}.



Εικόνα 4. Το κυκλικό νουκλεοτίδιο AMP

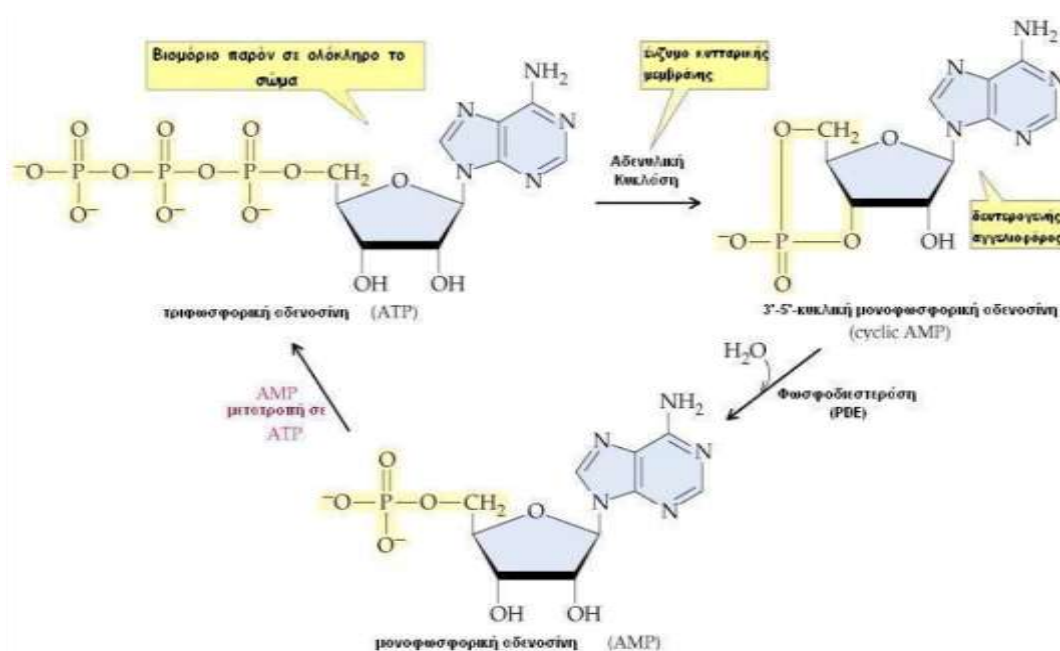
Πρόκειται για έναν σημαντικό δευτερογενή αγγελιοφόρο, ο οποίος μέσω αύξησης ή μείωσης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του, διαμεσολαβεί πλήθος ενδοκυττάρων οδών μεταγωγής σήματος, ρυθμίζοντας έτσι σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες σε σειρά κυττάρων και ιστών. Το cAMP εμπλέκεται στον έλεγχο γεγονότων εξωκυττάρωσης στα επιθηλιακά κύτταρα, στη β αδρενεργική σηματοδότηση στο καρδιαγγειακό σύστημα και στο λιπώδη ιστό, στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής λειτουργίας, στο συντονισμό των ανοσολογικών αποκρίσεων, ενώ είναι κυρίως γνωστό για τη σημαντική συμβολή του στη διάσπαση της γλυκόζης ⁸⁶.

Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του cAMP ρυθμίζεται ως αποτέλεσμα της ισορροπίας παραγωγής του, μέσω του ενζύμου αδενυλική κυκλάση (Adenylate Cyclase, AC), και της αποδόμησής του μέσω των φωσφοδιεστερασών του cAMP ⁸⁸. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως οι δράσεις της αυξημένης συγκέντρωσης cAMP διαμεσολαβούνται από την PKA, η οποία φωσφορυλιώνει κατάλληλα υποστρώματά του, ρυθμίζοντας έτσι σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός, ο κυτταρικός κύκλος και η μεταγραφή γονιδίων ⁸⁹.

Η μεταβολή της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του cAMP φαίνεται να επηρεάζεται και από άλλους δευτερογενείς αγγελιοφόρους. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του εξαρτώμενου από το ασβέστιο (Ca^{2+}) μονοπατιού μεταγωγής σήματος, το Ca^{2+} μπορεί να αυξήσει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του cAMP μετά από διέγερση της AC από την καλμοδουλίνη ή να αναστείλει τη δράση του ίδιου ενζύμου μέσω του Ca^{2+} και της ενεργοποίησης των μελών της οικογένειας της φωσφοδιεστεράσης1, που

αποδομούν το cAMP του κυττάρου. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί και η σημασία της αλληλεπίδρασης των δύο μονοπατιών παραμένουν αδιευκρίνιστοι ⁹⁰. Ποικιλία εξωκυττάρων σημάτων π.χ. ορμόνες, παράγοντες ανάπτυξης & νευροδιαβιβαστές, αυξάνουν τη φυσιολογική ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του cAMP στο κυτταρόπλασμα, επί το πλείστον μετά από ενεργοποίηση της AC και λιγότερο συχνά μετά από απενεργοποίηση των φωσφοδιεστερασών.

Μετά τη σύνθεση του και την επακόλουθη ενεργοποίηση των αποδεκτών του, το cAMP αποικοδομείται πολύ γρήγορα σε 5'-AMP από μια ή περισσότερες φωσφοδιεστεράσες των cAMP (Εικ. 5). Η ενεργότητα των φωσφοδιεστερασών ενισχύεται περαιτέρω μέσω φωσφορυλίωσης από την PKA, έτσι ώστε να ενισχύεται η διαδικασία τερματισμού του σήματος ⁹¹.



Εικόνα 5. Αποικοδόμηση του cAMP σε 5'-AMP μέσω φωσφοδιεστεράσεων των cAMP.

1.4 Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες (cytokines) είναι μικρού μοριακού βάρους (<30 kDa) διαλυτές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες που παράγονται από ποικιλία κυττάρων. Ο όρος κυτταροκίνες έχει πλέον καθιερωθεί συνολικά για τις λεμφοκίνες (lymphokines), οι οποίες εκκρίνονται από τα λεμφοκύτταρα και τις μονοκίνες (monokines), οι οποίες εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα ^{92,93}.

Πολλές κυτταροκίνες είναι γνωστές ως ιντερλευκίνες (interleukins) καθώς εκκρίνονται από λευκοκύτταρα και δρουν σε άλλα λευκοκύτταρα. Η οικογένεια των ιντερλευκινών πληθαίνει συνεχώς, με αποτέλεσμα έως σήμερα να έχουν ανακαλυφθεί 39 (ιντερλευκίνες 1-39, IL-1 - IL-39). Άλλες κυτταροκίνες διατηρούν τα αρχικά ονόματα τους όπως οι ιντερφερόνες (interferones) και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor). Μια άλλη γνωστή ομάδα κυτταροκινών είναι οι χημειοκίνες, που συμπεριλαμβάνουν κυτταροκίνες που επηρεάζουν τη χημειοταξία και άλλες λειτουργίες των λευκοκυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδη απόκριση^{92, 93}.

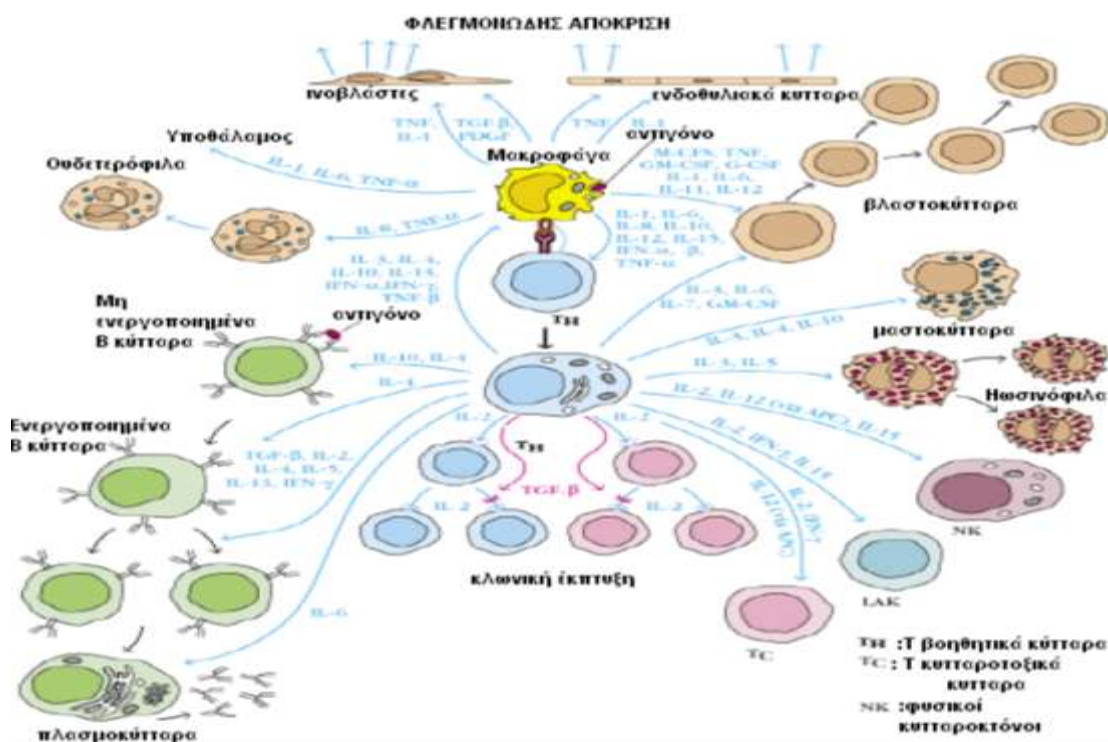
Ανάλογα με τη χημική τους δομή και τη δράση τους, οι κυτταροκίνες διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες :

1. Ιντερφερόνες (IFNs) στις οποίες περιλαμβάνονται οι IFNs α, β, γ και ω.
2. Λεμφοκυτταρικής και μακροφαγικής προέλευσης μεταβιβαστές, στις οποίες περιλαμβάνονται οι ιντερλευκίνες (ILs) 2, 5, 12 και 15.
3. Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στις οποίες περιλαμβάνονται οι IL-4, -10, -13 και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IL-1Ra).
4. Χημειοκίνες οι οποίες διακρίνονται στις χημειοκίνες α με κύριο εκπρόσωπο την IL-8, τις χημειοκίνες β με κύριους εκπροσώπους τις πρωτεΐνες χημειοταξίας των μονοκυττάρων MCP-1, 2, 3, 4 και τις χημειοκίνες γ που εκπροσωπούνται από την λεμφοτακτίνη.
5. Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες με κύριους εκπροσώπους τις IL-7, -11 και -13, την ερυθροποιητίνη και τους παράγοντες ενεργοποίησης σχηματισμού αποικοών των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων (GM-CSF, M-CSF και G-CSF).
6. Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που περιλαμβάνουν τον παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης (MIF), τους παράγοντες νέκρωσης των όγκων-α και -β και τις IL-1 και -6.
7. Διάφορες άλλες κυτταροκίνες οι οποίες εμπλέκονται στο μηχανισμό της ανοσοαπάντησης, αλλά δεν μπορούν να ενταχθούν στις προηγούμενες κατηγορίες, με κύριο εκπρόσωπο κατά την κύηση τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β

(TGF- β).

Ανάλογα με την ανοσολογική τους δράση, διακρίνονται:

- στις Th 1 κυτταροκίνες (όπως IL-2, IFN- γ και παράγοντας νέκρωσης των όγκων) που επάγουν σοβαρές κυτταροτοξικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις ελέγχοντας την κυτταρική ανοσία, και
- στις Th 2 κυτταροκίνες (όπως IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) που είναι συνδεδεμένες με τη βοηθητική δράση στην χυμική ανοσία.



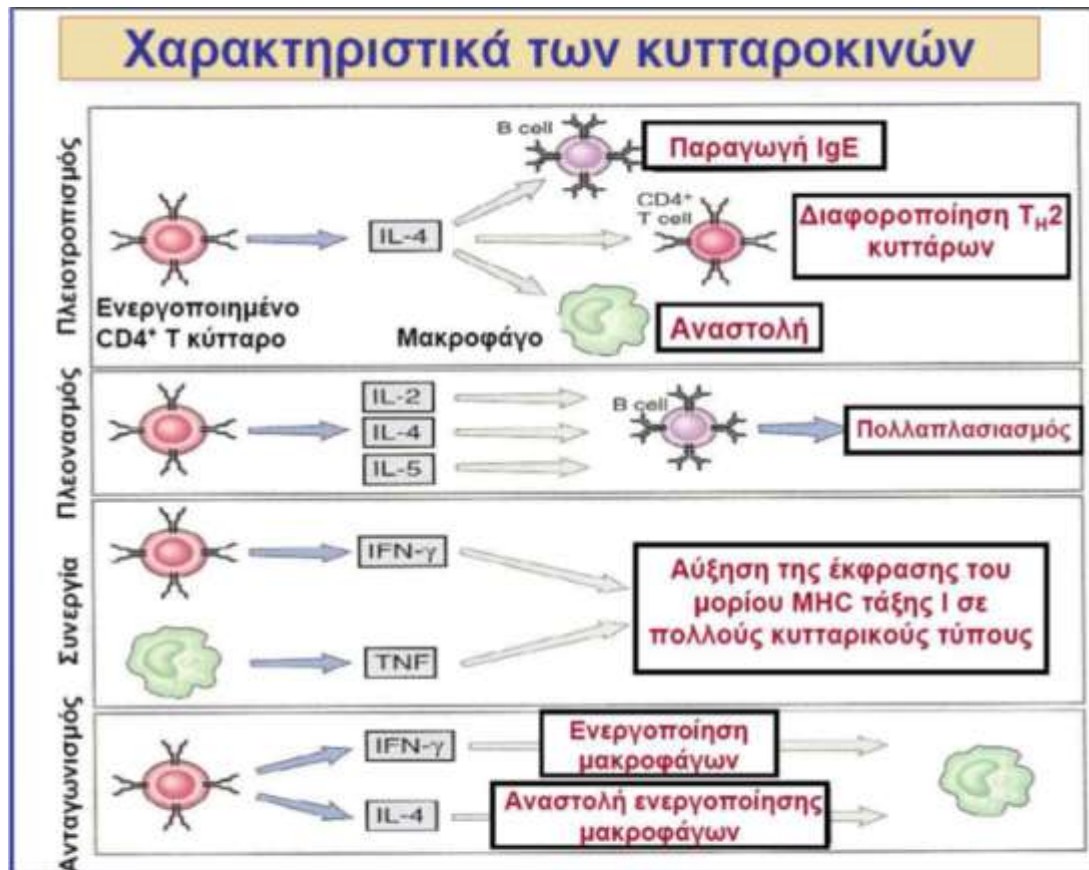
Εικόνα 6. Το δίκτυο των κυτταροκινών και η αλληλεπίδραση τους με άλλες κυτταροκίνες και κύτταρα.

Ένας συγκεκριμένος τύπος κυττάρου μπορεί να αποτελεί την κυριότερη πηγή μιας συγκεκριμένης κυτταροκίνης, ωστόσο μερικές κυτταροκίνες παράγονται από διάφορα κύτταρα. Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα T λεμφοκύτταρα, ειδικότερα τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα, αποτελούν τις κύριες κατηγορίες κυττάρων που παράγουν κυτταροκίνες κατά τη διάρκεια μιας ανοσολογικής απόκρισης. Οι

κυτταροκίνες παράγονται μετά από τη διέγερση των συγκεκριμένων κυττάρων, η έκκριση τους είναι συνήθως γρήγορη αλλά η δράση τους σύντομη σε διάρκεια, διαρκώντας από λίγες ώρες έως λίγες ημέρες, χρόνος ο οποίος είναι επαρκής για την ενεργοποίηση ενός ολόκληρου δικτύου κυττάρων. Οι κυτταροκίνες επίσης προκαλούν τη συνάθροιση και ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων που συμμετέχουν στη διεργασία της φλεγμονής (Εικ. 6).

Ο τρόπος δράσης των κυτταροκινών διακρίνεται σε αυτοκρινή (autocrine), όταν η κυτταροκίνη προσδένεται σε υποδοχείς του ίδιου του κυττάρου που την εκκρίνει, σε παρακρινή (paracrine) όταν η κυτταροκίνη προσδένεται σε υποδοχείς κυττάρων-στόχων που βρίσκονται κοντά στο κύτταρο που την εκκρίνει, καθώς και σε ενδοκρινή (endocrine) όταν η κυτταροκίνη προσδένεται σε υποδοχείς κυττάρων-στόχων που βρίσκονται σε απομακρυσμένα, από το κύτταρο έκκρισης της, σημεία του σώματος. Σε κάθε περίπτωση, οι δράσεις τους είναι δυνατόν να παρέμβουν στην συμπεριφορά των κυττάρων και με τον τρόπο αυτό π.χ. να συντονίσουν μια ανοσιακή απόκριση μέσω ρύθμισης της λειτουργίας των διαφορετικών κυττάρων που συμμετέχουν σε αυτήν^{92,93}.

Οι κυτταροκίνες λειτουργούν επίσης ως μηνυματοφόρα μόρια και επάγουν την έναρξη των βιολογικών τους δράσεων μετά από την πρόσδεσή τους σε ειδικούς υποδοχείς μεγάλης συγγένειας που βρίσκονται στη μεμβράνη των κυττάρων-στόχων τους, οδηγώντας βαθμιαία στην αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων αυτών. Με τον τρόπο αυτό, οι κυτταροκίνες ελέγχουν την ένταση και τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης με τη διέγερση ή την αναστολή της ενεργοποίησης, του πολλαπλασιασμού ή και της διαφοροποίησης διαφόρων κυττάρων, καθώς επίσης και με το να ρυθμίζουν την έκκριση αντισωμάτων ή άλλων κυτταροκινών (Εικ. 7).



Εικόνα 7. Ιδιότητες των κυτταροκινών και η αλληλεπίδραση τους με άλλες κυτταροκίνες και κύτταρα.

Οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από ένα λεμφοκύτταρο όταν αυτό ενεργοποιηθεί, μπορούν να επηρεάσουν και να ενεργοποιήσουν ένα ολόκληρο δίκτυο αλληλεπιδρώντων κυττάρων^{92,93}.

1.4.1. Ιντερλευκίνη-10 (IL-10)

Η IL-10 αποτελεί μια ζωτικής σημασίας πλειοτρόπο κυτταροκίνη με ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Πρόκειται για κυτταροκίνη με ισχυρή αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση. Ο κύριος ρόλος της έγκειται στην αναστολή της δράσης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, οδηγώντας σε αναστολή της Th1-διαμεσολαβούμενης απόκρισης. Η παραγωγή της IL-10 ρυθμίζεται τόσο σε μεταφραστικό όσο και σε μεταγραφικό επίπεδο⁹⁴. Στην πόλωση της ανοσολογικής απόκρισης προς Th1 ή Th2 κατεύθυνση, η IL-10 θεωρείται σημαντική αν και

προσφάτως έχει εμπλακεί στη διαφοροποίηση και άλλων υποπληθυσμών Τ λεμφοκυττάρων όπως τα Τ ρυθμιστικά (Tregs) λεμφοκύτταρα^{95, 96, 97, 98}.

Η ανθρώπινη IL-10 είναι μια πρωτεΐνη 160 αμινοξέων, μοριακού βάρους 18,5 kDa που δρα σαν ένα 37 kDa ομοδιμερές. Η IL-10 ανήκει στην οικογένεια κυτταροκινών τάξης II, η οποία εκτός από την IL-10 συμπεριλαμβάνει επίσης τις IGNs τύπου I και την IFN- γ ^{99,100}. Η οικογένεια των IL-10 κυτταροκινών πληθαίνει συνεχώς και συμπεριλαμβάνει υποομάδες κυτταρικών και ιικών μορφών της IL-10. Η υποομάδα που περιέχει τις κυτταρικές IL-10 συμπεριλαμβάνει εκτός από την IL-10 και πέντε παραλλαγές της, τις IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 και IL-26. Η κυτταρική μορφή της IL-10 παράγεται από ποικιλία κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των Β λεμφοκυττάρων, των δενδριτικών και των ηωσινόφιλων. Σημαντικότερες πηγές παραγωγής της κυτταρικής μορφής της IL-10 ωστόσο θεωρούνται τα Τ λεμφοκύτταρα, ειδικότερα τα Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα^{101,102,103}.

Επίσης, η παρουσία βακτηρίων, ιών, παρασίτων ή προϊόντων τους είναι ικανή να επάγει την παραγωγή της IL-10 από τα κύτταρα-ξενιστές. Οι ιικές μορφές της IL-10 θεωρείται ότι χρησιμεύουν σαν μοριακό δέλεαρ για την καθοδήγηση της ανοσολογικής απόκρισης. Η υποομάδα των ιικών μελών της IL-10 συμπεριλαμβάνει την IL-10 του ιού Epstein-Barr και επτά μέλη που εμπεριέχονται σε μεγάλους DNA ιούς¹⁰⁴ (π.χ. ιό του έρπητα).

Οι βιολογικές δράσεις της IL-10 λαμβάνουν χώρα μετά την ενεργοποίηση ενός σηματοδοτικού μονοπατιού το οποίο ενεργοποιείται μετά από την πρόσδεση της IL-10 στον υποδοχέα της που εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων της, π.χ. στα μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα κ.α.. Ο υποδοχέας της IL-10, ανήκει στην ομάδα υποδοχέων γνωστών ως υποδοχείς τύπου IFN- γ ¹⁰⁵.

Η πρόσδεση της IL-10 στον υποδοχέα της ενεργοποιεί ένα μηχανισμό μεταγωγής σήματος που καταλήγει στο εσωτερικό του κυττάρου-στόχου της, ο οποίος είναι κοινός για την κατηγορία υποδοχέων αυτού του τύπου. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της IL-10, η αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα της έχει σαν αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίηση της JAK κινάσης. Ανάμεσα στα γονίδια που ενεργοποιούνται από την IL-10 συμπεριλαμβάνονται οι SOCS-1 και SOCS-3. Η SOCS-1 αποτελεί τον κύριο φυσιολογικό αναστολέα των

επαγομένων μηχανισμών μεταγωγής σήματος των κυτταροκινών IFN- γ , IL-10 και IL-4.

Οι βιολογικές δράσεις της IL-10 συμπεριλαμβάνουν:

- Αναστολή της παραγωγής κυτταροκινών (π.χ. IL-12, IL-18) καθώς και την παρεμπόδιση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD80, CD86 και MHC II από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.
- Αναστολή της έκφρασης της IL-2, του TNF, και της IL-5, επηρεάζοντας τη λειτουργία των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων.
- Αναστολή της δράσης άλλων κυτταροκινών, όπως της IL-2, TNF- α , IFN- γ και IL-4.
- Ενίσχυση της δράσης των B λεμφοκυττάρων, αυξάνοντας την επιβίωσή τους.
- Άσκηση ισχυρής αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω αναστολής της παραγωγής TNF και IL-1 σε καταστάσεις οξείας ανοσιακής διέγερσης και φλεγμονής.
- Προστασία από σηπτικό σοκ προκαλούμενο από τοξίνες Gram(+) όσο και τον λιποπλυσακχαρίτη (LPS) Gram(-) βακτηρίων, τόσο σε in vivo όσο και όσο και σε in vitro πειραματικά μοντέλα.
- Ρύθμιση της παραγωγής μεταγραφικών παραγόντων. Π.χ. ενεργοποιεί τους NF- κ B και AP-1 σε CD8⁺ T λεμφοκύτταρα αλλά τους αναστέλλει σε μονοκύτταρα και σε CD4⁺ T λεμφοκύτταρα.

Το γεγονός πως όλες οι διαφορετικές υποομάδες των T λεμφοκυττάρων μπορούν να παράγουν διαφορετικές ποσότητες IL-10 ανάλογα με το σήμα που δέχονται από το εξωκυττάριο περιβάλλον τους, προσδίδει στην κυτταροκίνη αυτή έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης^{106,107}.

1.4.2. Ιντερλευκίνη-2 (IL-2)

Η IL-2 παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, και σε μικρότερες ποσότητες από τα ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα. Πρόκειται για κυτταροκίνη που

λειτουργεί ως αυτοκρινής ή παρακρινής διεγέρτης του πολλαπλασιασμού των T και B λεμφοκυττάρων ¹⁰⁸.

Η ενεργοποίηση των T κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση της IL-2 και του υποδοχέα της (IL-2 receptor, IL-2R) που εκφράζεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων και κατά συνέπεια την αυτοκρινή διέγερση των T λεμφοκυττάρων για διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό. Με τον τρόπο αυτό η IL-2 ευθύνεται για τη προώθηση των T λεμφοκυττάρων από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου.

Ο IL-2R βρίσκεται κυρίως στα T και στα φυσικά φονικά (NK) κύτταρα. Η ύπαρξη 3 υπομονάδων του IL-2R, προσδίδουν διαφορετική συγγένεια των κυττάρων στην IL-2 σαν αποτέλεσμα του συνδυασμού των τριών υποομάδων, μονομερών (α), ετεροδιμερών (α/β και β/γ) και ετεροτριμερών ($\alpha/\beta/\gamma$). Η α -αλυσίδα του IL-2R (55 kD, Tac-antigen, CD25) εκφράζεται στα T κύτταρα. Η IL-2 αποτελεί τον τελικό αποδέκτη της μεταγωγής σήματος μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα. Εκτός από τα T κύτταρα, και άλλα κύτταρα π.χ. τα B λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα της IL-2, διεγείρονται με αποτέλεσμα την διαφοροποίησή τους και τον πολλαπλασιασμό τους ¹⁰⁹.

Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι όλοι οι υποπληθυσμοί των περιφερικών λευκοκυττάρων, ειδικά των μονοπύρηνων (PBMC) που συμμετέχουν στην κυτταρική ανταπόκριση, δεν είναι ευαίσθητοι στην IL-2, και ότι η απόκρισή τους στην IL-2 ενεργοποιείται μετά από αντιγονική πρόκληση. Πάντως, τα κύτταρα που παίρνουν μέρος σε φλεγμονές και αντιδράσεις κατά των όγκων είναι ευαίσθητα στην ενεργοποίηση από την IL-2.

Άλλες λειτουργίες της IL-2 συμπεριλαμβάνουν την ενίσχυση της κυτταροτοξικής δράσης των NK κυττάρων, καθώς και τη διέγερση των B λεμφοκυττάρων προς σύνθεση και έκκριση αντισωμάτων ¹⁰⁹.

1.4.3. Ιντερλευκίνη-4 (IL-4)

Κύρια κυτταρική πηγή της IL-4 είναι ο υποπληθυσμός Th2 των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, επί των οποίων, καθώς και επί των βασεόφιλων κυττάρων των ιστών, ασκεί αυτοκρινή δράση αυξητικού παράγοντα. Στην πραγματικότητα, η παραγωγή της IL-4 αποτελεί κριτήριο κατάταξης των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στον υποπληθυσμό των Th2 κυττάρων (το αντίστοιχο κριτήριο κατάταξης στον υποπληθυσμό Th1 είναι η παραγωγή της IFN-γ).

Βασική της λειτουργία είναι η ρύθμιση των αλλεργικών αντιδράσεων. Η IL-4 είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη που παράγεται κυρίως από μερικά Th κύτταρα, από ιστιοκύτταρα και βασεόφιλα. Οι δράσεις της IL-4 περιλαμβάνουν:

- Τη διέγερση, ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων.
- Την αύξηση της έκφρασης των MHC-μορίων τάξης II στα B λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αντιγονοπαρουσιαστικής ικανότητας αυτών των κυττάρων.
- Την αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, γεγονός που διευκολύνει την έξοδο των λευκοκυττάρων στον εξωαγγειακό χώρο.
- Την ελάττωση του ρυθμού σύνθεσης διαφόρων κυτταροκινών από μερικά T λεμφοκύτταρα και μακροφάγα.

Σε αντίθεση με την IL-1, την IL-6 και την IL-10 που παράγονται από ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων, η IL-4 όπως και η IL-2 και η IFN-γ παράγονται από μικρό αριθμό κυττάρων. Η παραγωγή της IL-4 περιορίζεται στην υποομάδα Th2 των ενεργοποιημένων T κυττάρων, αλλά έχει περιγράψει και από τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα και σε μερικές κυτταρικές σειρές μυελού των οστών που εξαρτώνται από την IL-3.

Τα Th2 κύτταρα ελέγχουν τη χυμική ανοσολογική ανταπόκριση (humoral immunity) και την παραγωγή IgE. Σημαντικό χαρακτηριστικό σ' αυτές τις διαφορετικές

υποομάδες είναι η ικανότητα της καθεμιάς να ελέγχει τις λειτουργίες της άλλης. Η INF- γ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των Th2 κυττάρων, ενώ η IL-4 και η IL-10 αναστέλλουν την παραγωγή κυτταροκινών από τα κύτταρα Th1. Η IL-4 αντλεί τη βιολογική της δράση από ένα ειδικό υποδοχέα υψηλής συγγένειας που εκφράζεται από τα αιμοποιητικά κύτταρα, όπως τα αθώα T και B κύτταρα, και μία σειρά κυττάρων αντιπροσωπευτικών των μακροφάγων (π.χ. P388DI) και των μαστοκυττάρων (π.χ. ABFTL-2).

Τόσο η ανθρώπινη IL-4 όσο και αυτή του ποντικού παράγεται από βασεόφιλα και μαστοκύτταρα ενεργοποιημένα από τη σύνδεση της IgE στους υποδοχείς Fc.

1.4.4. Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)

Η IL-6 είναι μια κυτταροκίνη που ρυθμίζει ποικιλία γεγονότων, όπως την κυτταρική διαίρεση και τη διαφοροποίηση, την επιβίωση αλλά και την απόπτωση των κυττάρων. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, στην αιμοποίηση και στη φλεγμονή. Επί πλέον, δρα σε μια πληθώρα συστημάτων όπως το νευρικό, το ενδοκρινικό, στον οστικό μεταβολισμό, στους σκελετικούς μυς, καθώς και σε πολλά άλλα συστήματα και όργανα ¹¹⁰.

Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1980 από τον Weissenbach ¹¹¹ ως «IFN- β 2» και το 1986-1987 διαπιστώθηκε ταύτιση με τον διεγερτικό παράγοντα των B λεμφοκυττάρων, τον αυξητικό παράγοντα πλασματοκυτταρικού υβριδώματος και της 26 kDa πρωτεΐνης ¹¹². Η IL-6 είναι μια πολυλειτουργική κυτταροκίνη, με μοριακό βάρος 21 kDa, η οποία αποτελείται από 184 αμινοξέα ¹¹³. Ερευνητές παρασκεύασαν βιολογικά δραστική IL-6, με βάση την αλληλουχία του ανθρώπινου cDNA ¹¹⁴.

Παράγεται τόσο από λεμφοειδή όσο και από μη λεμφοειδή κύτταρα και ρυθμίζει την ανοσολογική απάντηση οξείας φάσης και την αιμοποίηση ¹¹⁵. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση τοπικών και συστηματικών μηχανισμών, που αποσκοπούν στην προστασία του ξενιστή με τελικό σκοπό τον περιορισμό της ιστικής βλάβης. Η IL-6 προκαλεί μεγάλες μεταβολές στη βιοχημική, φυσιολογική και ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή προάγοντας:

- την παραγωγή πρωτεϊνών απάντησης οξείας φάσης

- ☐ την ενεργοποίηση των B και T λεμφοκυττάρων, και των NK κυττάρων
- ☐ τη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων και των μυελοκυττάρων
- ☐ τη διέγερση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση
- ☐ την παραγωγή του παράγοντα διέγερσης σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων (GM-CSF)
- ☐ την παραγωγή της φλοιοτρόπου ορμόνης (ACTH)
- ☐ την ωρίμανση των κυτταροτοξικών T κυττάρων
- ☐ τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων
- ☐ την αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της IL-2 ¹¹⁶.

Στα υγιή άτομα τα επίπεδα της IL-6, είναι κάτω από 5 pg/mL ¹¹⁷. Αυξημένα επίπεδα της παρατηρούνται στα ανθρώπινα υγρά κατά τη διάρκεια οξέων και χρόνιων λοιμώξεων, νεοπλασιών, αυτοάνοσων νόσων, κ.α. Ωστόσο, αυξημένες συγκεντρώσεις της διαπιστώθηκαν και στον ορό φυσιολογικών ατόμων μετά από στρες, γεγονός που δείχνει ότι η κυτταροκίνη αυτή πρέπει να ασκεί σημαντικές φυσιολογικές και παθολογικές δραστηριότητες.

Κατά τη διάρκεια συστηματικής φλεγμονής τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής της ¹¹⁸. Ενδείξεις για αυτή την υπόθεση αποτελεί το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά:

- 1) είναι άφθονα και βρίσκονται κατανεμημένα σε όλο τον οργανισμό
- 2) έχουν μεγάλη ικανότητα να συνθέτουν και να εκκρίνουν IL-6
- 3) η διέγερση παραγωγής της IL-6 απ' αυτά μπορεί να επαχθεί υπό την επίδραση αρκετών παραγόντων.

Οι υποδοχείς της έχουν μοριακό βάρος 80 kDa, αποτελούνται από 468 αμινοξέα και υπάρχουν σε λεμφοειδή (διεγερμένα B λεμφοκύτταρα, T λεμφοκύτταρα) και μη λεμφοειδή κύτταρα. Τα φυσιολογικά και μη διεγερμένα B λεμφοκύτταρα δεν

εκφράζουν υποδοχείς της IL-6, ενώ ενεργοποιημένοι B λεμφοβλάστες εκφράζουν τέτοιους υποδοχείς ¹¹⁹. Σύμφωνα με αυτά, η IL-6 διεγείρει την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα. Επίσης, διέγερση μονοκυττάρων με LPS ή IL-1 αναστέλλει την παραγωγή του mRNA των υποδοχέων της IL-6 και ταυτόχρονα αυξάνει την έκφραση του mRNA της IL-6 ¹²⁰.

Διαλυτοί υποδοχείς της IL-6 (όπως και της IL-2) έχουν βρεθεί στα ούρα ¹²¹, γεγονός που δείχνει ότι η απελευθέρωση διαλυτών υποδοχέων των κυτταροκινών σε σημαντικά βιολογικά υγρά αποτελεί ένα γενικό φαινόμενο που συμβαίνει και σε φυσιολογικές καταστάσεις ¹²².

Οι παράγοντες που αυξάνουν την έκφραση/παραγωγή της IL-6 από τους ινοβλάστες είναι :

- ☐ κυτταροκίνες, όπως ο TNF, οι IL-1, -2, -3 και η IFN- γ ^{123,124,125}.
- ☐ ο παράγοντας διέγερσης σχηματισμού αποικιών (CSF) ¹²⁶.
- ☐ ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF) ¹²⁷.
- ☐ ο LPS ¹²⁸.
- ☐ βακτήρια ¹²⁹
- ☐ ιοί, όπως ο HIV κ.α. ^{130,131}.

Ο TNF, η IL-1 και ο LPS διεγείρουν επίσης την έκφραση του γονιδίου της IL-6 στα μονοκύτταρα/μακροφάγα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα ^{132,133}.

Αρνητική ρύθμιση της σύνθεσής της προκαλείται από τα γλυκοκορτικοειδή. Η δεξαμεθαζόνη δηλαδή αναστέλλει τη σύνθεση της IL-6 από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα, σε διάφορους ιστούς και τύπους κυττάρων ¹³⁴.

Η κατανομή της και ο μεταβολισμός της μελετήθηκαν μετά από ενδοφλέβια χορήγηση της ανθρώπινης ραδιοσημασμένης IL-6 (¹²⁵I-rhIL-6). Είκοσι λεπτά (20') μετά την έγχυσή της παρατηρήθηκε πρόσληψή της από το ήπαρ (σε ποσοστό 80% εντοπίστηκε στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων), τους νεφρούς, το σπλήνα, την καρδιά, το θύμο αδέν, τους πνεύμονες, τους μύες και το λεπτό έντερο. Η εντόπιση

της IL-6 κυρίως στο ήπαρ υποδηλώνει την ύπαρξη υποδοχέων της στα συγκεκριμένα κύτταρα. Το εύρημα αυτό δείχνει πως η IL-6 είναι ισχυρός διεγέρτης των ηπατοκυττάρων για την παραγωγή πρωτεϊνών απάντησης οξείας φάσης¹³⁵.

Η IL-1 και ο TNF προάγουν τη σύνθεση της IL-6 και από κοινού οι τρεις κυτταροκίνες συνεργάζονται για τη διέγερση παραγωγής πρωτεϊνών απάντησης οξείας φάσης. Τόσο η IL-1 όσο και η IL-6 διεγείρουν και τη σύνθεση της ACTH¹³⁴. Η ρύθμιση αυτή διεγείρει την παραγωγή κορτιζόλης που βοηθά στη συνέχεια την προώθηση της απάντησης οξείας φάσης. Η κορτιζόλη όμως δρα ταυτοχρόνως και ανασταλτικά στην παραγωγή των IL-1, IL-6 και του TNF, τερματίζοντας έτσι τη φλεγμονή και την απάντηση οξείας φάσης.

Η IL-6 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της παραγωγής του TNF, αναστέλλοντας την επίδραση του LPS πάνω στα μονοκύτταρα σε ότι αφορά τη σύνθεση αυτού του παράγοντα. Ωστόσο η IL-6 καταστέλλει και την παραγωγή της IL-1, που οφείλεται στη δράση της ενδοτοξίνης και του TNF¹³⁶. Η IL-6 επιδρά σε περισσότερα από ένα επίπεδα, πάνω στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια¹³⁷. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η IL-6 παράγεται και από την υπόφυση και διεγείρει την απελευθέρωση ACTH (δράση που αναστέλλεται από τα κορτικοειδή)¹³⁸, προλακτίνης, αυξητικής ορμόνης και άλλων ορμονών του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης¹³⁹.

Η IL-6 έχει αρκετά όργανα και κύτταρα-στόχους και η υπόθεση ότι η παραγωγή και η διέγερσή της μπορεί να γίνει από μεγάλη ποικιλία κυττάρων και διεγερτών, εξηγεί το γεγονός της εμπλοκής της σε μεγάλη ποικιλία λοιμωδών και αυτοάνοσων διαταραχών¹⁴⁰.

Έτσι αυξημένα επίπεδά της βρέθηκαν σε:

Καρδιαγγειακές παθήσεις (έμφραγμα μυοκαρδίου, καρδιακό μύζωμα)¹⁴¹.

Ρευματοειδή αρθρίτιδα¹⁴².

Μεσαγγειακή υπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα¹⁴³.

Σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS)¹⁴⁴.

Ηπατοπάθειες ¹⁴⁵.

Σακχαρώδη διαβήτη τύπου I ¹⁴⁶.

Κακοήθεις νόσους (λέμφωμα, λευχαιμία, καρκίνο νεφρού, μαστού, και ωοθηκών)
^{147,148,149,150,151}.

Αυξημένα επίπεδα IL-6 βρέθηκαν και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε προγραμματισμένες χειρουργικές επεμβάσεις. Απελευθερώνονται όσο διαρκεί η επέμβαση και παραμένουν υψηλά για 4-48 ώρες, ενώ μειώνονται μετά από 48-72 ώρες ¹⁵². Επίσης, η IL-6 μαζί με τον TNF-α και την IL-1 αποτελούν πυρετογόνες ουσίες. Ενδοφλέβια χορήγηση rhIL-6 σε κουνέλια προκαλεί γρήγορη αύξηση της θερμοκρασίας που φθάνει στο μέγιστο 60' μετά την έγχυσή της ¹⁵³. Σε καταστάσεις στρες, τα αυξημένα επίπεδα αδρεναλίνης διεγείρουν την απελευθέρωση IL-6 με μηχανισμό που αναστέλλεται από την προπρανολόλη ¹⁵⁴.

Ωστόσο, φαίνεται πως η επίδρασή της είναι λιγότερο τοξική σε σχέση με αυτή των άλλων κυτταροκινών, όπως π.χ. σε περιπτώσεις φλεγμονών, όπου έχουμε την παρουσία τόσο της IL-6 όσο και της IL-1 και του TNF. Η ικανότητά της να αναστέλλει την παραγωγή του TNF, υποδηλώνει ότι η αυξημένη παραγωγή της από τη δράση του τελευταίου, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των τοξικών επιδράσεων του ¹⁵⁵.

1.4.5. Παράγων νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor, TNF-α)

Πρόκειται για ένα μη-γλυκοζυλιωμένο πολυπεπτίδιο 157 αμινοξέων, με μοριακό βάρος 17 kDa ¹⁵⁶, το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1975 από τον Carswell ¹⁵⁷. Το μόριο του πολυμερίζεται *in vitro* και σχηματίζει ποικίλου μεγέθους πρωτεΐνες (διμερή ως πολυμερή), οι γενετικοί τόποι των οποίων εδράζονται στενά συνδεδεμένοι εντός του γενετικού τόπου του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Η ολιγομερής μορφή του πιστεύεται ότι είναι η βιολογικά δραστική ¹⁵⁸. Το γονίδιο του ανθρώπινου TNF βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 ¹⁵⁹.

Κύρια κυτταρική πηγή του TNF-α είναι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα ¹⁶⁰. Επίσης παράγεται από τα περιφερειακά λεμφοκύτταρα ¹⁶¹, από τα

NK κύτταρα ¹⁶² και από τα πολυμορφοπύρρηνα ¹⁶³. 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 ¹⁶⁴.

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 καταστροφή των μικροβίων, και διεγείρει την παραγωγή 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 κυτταροκίνης 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 μεσολαβεί η δράση του TNF στα ηπατοκύτταρα.

Περαιτέρω αύξηση της παραγωγής του έχει ως αποτέλεσμα τοξικά φαινόμενα όπως μείωση της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου και μείωση της αιματικής άρδευσης των ιστών, χάλαση του τόνου των λείων μυών των αγγείων και ελάττωση της αρτηριακής πίεσης, ενδαγγειακή θρόμβωση καθώς και σοβαρές μεταβολικές διαταραχές. Οι επίδρασή του και οι πολλαπλές δραστηριότητές του επιτελούνται διαμέσου ειδικών κυτταρικών υποδοχέων ¹⁶⁵. Υποδοχείς του TNF υπάρχουν σ' όλα τα κύτταρα –πλην των ερυθροκυττάρων– σε διαφορετικό όμως αριθμό. Η ευρεία αυτή κατανομή των TNF υποδοχέων αντανακλά και την πλειοτροπική και εκτεταμένη επίδραση του TNF ¹⁶⁶.

Έτσι ο TNF-α:

- ☐ Αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή της οξείας φάσης απάντησης του ήπατος (ρυθμιστής της ανοσίας και της φλεγμονής) ¹⁶⁷.
- ☐ Είναι ενδογενής πυρετογόνος ουσία, αφού αυξάνει την παραγωγή της

προσταγλανδίνης E2 στον εγκέφαλο, ενώ η ενδοφλέβια χορήγησή του προκαλεί πυρετό μετά από περίπου 50 λεπτά ¹⁶⁸.

□ Είναι υπεύθυνος για τα παρανεοπλασματικά σύνδρομα σε ασθενείς με καρκίνο (υπερασβεσταιμία, λευκοκυττάρωση, καχεξία) ¹⁶⁹.

□ Ασκήι αντικαρκινική δράση (κυτταροτοξική-κυτταροστατική) προκαλώντας εκτεταμένες αιμορραγίες και νέκρωση του όγκου, ενώ δεν δρα στα φυσιολογικά κύτταρα in vivo και in vitro ¹⁷⁰.

□ Ασκήι δράσεις ορμόνης σε ποικίλα κύτταρα-στόχους ¹⁷¹. Τοπική και παροδική παραγωγή του είναι ωφέλιμη για τον ξενιστή, αλλά η παρατεταμένη και συστηματική είναι επιβλαβής. Η είσοδός του στη συστηματική κυκλοφορία προκαλεί υπόταση, μεταβολική οξέωση (λόγω μείωσης της ιστικής αιμάτωσης), παροδική υπεργλυκαιμία που ακολουθείται από υπογλυκαιμία, υπερκαλιαιμία, ισχαιμικές και αιμορραγικές βλάβες στο γαστρεντερικό σύστημα, αιμορραγία στα επινεφρίδια και το πάγκρεας, οξεία σωληναριακή νέκρωση στους νεφρούς και σοβαρή διάμεση πνευμονίτιδα ¹⁷².

Σχέση με άλλες κυτταροκίνες:

Ο TNF-α διεγείρει την παραγωγή και άλλων κυτταροκινών που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και στην ενίσχυση της ανοσολογικής απάντησης, όπως της IL-1, της IL-6, της IFN-γ και του GM-CSF. Η IL-1 αυξάνει την παραγωγή του από τα μονοκύτταρα, ενώ η IFN-γ, ο GM-CSF και ο ίδιος ο TNF διεγείρουν τη σύνθεση και απελευθέρωσή του από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα ¹⁷³.

Οι κυριότεροι διεγέρτες παραγωγής του TNF-α είναι:

□ Ο LPS ο οποίος αποτελεί τον ισχυρότερο διεγέρτη παραγωγής του ¹⁷⁴.

□ Ιοί, παράσιτα, μύκητες κ.α. ^{175,176}.

□ Πολλές κυτταροκίνες, όπως η IL-1 και IL-2, η IFN-α και IFN-γ, καθώς και οι παράγοντες διέγερσης σχηματισμού αποικιών όπως ο GM-CSF ¹⁷⁷.

Οι κυριότεροι αναστολείς της παραγωγής του TNF-α είναι:

□ Τα κορτικοειδή (δεξαμεθαζόνη) ¹⁷⁸.

- ☐ Οι προσταγλανδίνες (PGE₂)¹⁷⁹.
- ☐ Η πεντοξυφιλίνη¹⁸⁰.
- ☐ Τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (κυκλοσπορίνη)¹⁸¹.
- ☐ Τα αντισώματα έναντι του TNF-α (anti-TNF-α)¹⁸².

Νόσοι που σχετίζονται με την παραγωγή TNF-α:

- ☐ Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας Ενηλίκων (ARDS)¹⁸³.
- ☐ Σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS)¹⁸⁴.
- ☐ Καρδιακή ανεπάρκεια¹⁸⁵.
- ☐ Παρασιτικές λοιμώξεις¹⁸⁶.
- ☐ Ηπατικά νοσήματα (αποφρακτικός ίκτερος, ηπατίτιδα Β, αλκοολική ηπατίτιδα)¹⁸⁷.
- ☐ Ρευματοειδής αρθρίτιδα¹⁸⁸.
- ☐ Σηπτικό shock¹⁸⁹.
- ☐ Μεταμοσχεύσεις (πχ. απόρριψη μοσχεύματος νεφρού)¹⁹⁰, κ.α.

1.4.6. Ιντερφερόνη - γ (IFN-γ)

Οι ιντερφερόνες (IFNs) ανακαλύφθηκαν το 1957 από τους Isaacs και Lindenmann, οι οποίοι μελετώντας καλλιέργειες κυττάρων μολυσμένες με ιό διαπίστωσαν την παραγωγή βιολογικών παραγόντων που παρεμβαίνουν και παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό άλλων ιών στην ίδια κυτταροκαλλιέργεια¹⁹¹.

Το 1980 εδόθη ο ορισμός της IFN ως μιας πρωτεΐνης που ασκεί αντιϊκή δράση χωρίς όμως ιική εξειδίκευση, σε αυτόλογα κύτταρα μέσω μεταβολικών διεργασιών του κυττάρου που συμπεριλαμβάνουν την σύνθεση αντι-ικών RNA και πρωτεϊνών¹⁹².

Τα πειράματα που ακολούθησαν αποκάλυψαν ότι η IFN παράγεται σε διάφορες ιογενείς λοιμώξεις και ασκεί πολύ ισχυρή ανοσολογική δράση, αφού λίγα μόνο μόρια

της είναι ικανά να προκαλέσουν κυτταρική απάντηση. Η δυνατότητα παρασκευής καθαρών IFNs με μεθόδους γενετικής μηχανικής σε μεγάλες ποσότητες, άνοιξε νέους δρόμους στη μελέτη τους και στο μηχανισμό δράσης τους και έφερε επανάσταση στην κλινική πράξη κυρίως στην αντιμετώπιση του καρκίνου αλλά και των ιογενών λοιμώξεων.

Αρχικά το 1980 προτάθηκε η ταξινόμηση των IFNs ανάλογα με τα κύτταρα που τις παράγουν. Ως IFN-α ορίστηκαν οι IFNs που επάγονται σε καλλιέργειες φυσιολογικών λευκοκυττάρων τα οποία έχουν μολυνθεί με κάποιο ιό. Ως IFN-β ορίστηκαν οι IFNs που επάγονται σε διπλοειδείς και ανευπλοειδείς ινοβλάστες οι οποίοι έχουν μολυνθεί με κάποιο ιό. Ως IFN-γ ή ανοσοϊντερφερόνη ορίστηκαν οι IFNs που παράγονται από Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία προηγουμένως έχουν διεγερθεί από αντιγονικά ή μιτογόνα ερεθίσματα. Έκτοτε και έως και τις αρχές της δεκαετίας του 1990, οι IFN-α και IFN-β ομαδοποιήθηκαν ως IFNs τύπου 1 λόγω της εκτεταμένης ομολογίας στην αλληλουχία των αμινοξέων των πεπτιδικών των αλυσίδων (μήκους 165-172 αμινοξέων), καθώς και από την παρατήρηση ότι συνδέονται με τον ίδιο υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη ¹⁹³. Η ειδικότερη ταξινόμηση των υποτύπων της IFN-α (14 περίπου) ποικίλλει από εργαστήριο σε εργαστήριο και φέρουν τις ονομασίες άλφα-1, άλφα-2 κ.λπ.. Η πλέον πρόσφατη ονοματολογία χαρακτηρίζει τις λευκοκυτταρικές IFNs ως IFN-α και IFN-ω αντί για άλφα-1 και άλφα-2 αντίστοιχα ¹⁹⁴. Η IFN-γ είναι το μοναδικό μέλος της οικογένειας των IFNs τύπου 2.

Η IFN-γ είναι διμερής γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 20-25 kDa, με υπομονάδες μήκους 166 αμινοξέων εκ των οποίων τα 143 αποτελούν το λειτουργικό τμήμα της πρωτεΐνης. Η δράση της IFN-γ είναι ειδική για το κάθε είδος οργανισμού και αυτό οφείλεται στη μικρή ομολογία της πεπτιδικής αλυσίδας μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Η ώριμη μορφή της πρωτεΐνης είναι αρκετά αλκαλική με ισοηλεκτρικό σημείο pI 8,3-8,5. Το μόριό της περιέχει δύο κυστεΐνες μεταξύ των οποίων υπάρχει ένα αμινοξύ, αλλά δεν είναι γνωστό αν σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός.

1.5 Τύποι ανοσολογικής απόκρισης

Τα Τ λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος. Έχουν συγκεκριμένους μεμβρανικούς υποδοχείς αναγνώρισης αντιγόνου, τους TCRs

(T cell Receptors), παράγονται στο μυελό των οστών και διαφοροποιούνται στο θύμο αδένι¹⁹⁵. Τα T λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν τους αντιγονικούς επιτόπους του εαυτού καταστρέφονται εντός του θύμου αδένι, μέσω της διαδικασίας της αρνητικής θυμικής επιλογής, αλλά είναι γνωστό ότι πολλά από αυτά διαφεύγουν αυτής της διαδικασίας και εξέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος¹⁹⁶.

Τα T λεμφοκύτταρα χωρίζονται σε 3 υποπληθυσμούς με βάση την έκφραση των μορίων CD4, CD8 και CD16 στην επιφάνειά τους. Τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα μέσω της έκκρισης κυτταροκινών έχουν ρυθμιστικές ιδιότητες και σε αυτά περιλαμβάνονται τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (helper T cells, Th), ενώ τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα είναι κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (cytotoxic T cells, Tc), καθώς ενεργοποιούνται έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου και οδηγούν στη θανάτωση των κυττάρων που το εκφράζουν¹⁹⁷. Τα CD16⁺ λεμφοκύτταρα, είναι τα NK κύτταρα τα οποία λύουν συγκεκριμένες ομάδες κυττάρων, που δεν εκφράζουν ή εκφράζουν τροποποιημένα MHC μόρια τάξης I¹⁹⁸. Επιπλέον, υπάρχει μία ομάδα T λεμφοκυττάρων, τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Regulatory T cells, Tregs), τα οποία ανήκουν στα CD4⁺ T κύτταρα και ρυθμίζουν ή περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, συμμετέχοντας στην αυτοανοχή και ομοιόσταση του οργανισμού¹⁹⁹.

Σύμφωνα με έρευνες που έγιναν στο ζωικό μοντέλο της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ), τα Th1 CD4⁺ T κύτταρα διαφοροποιούνται παρουσία IL-12 και εκκρίνουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως IFN-γ, IL-2 και TNF. Δρουν ενισχυτικά στην καταστροφή των ξένων παθογόνων, αλλά οδηγούν και σε ιστική καταστροφή, προκαλώντας φλεγμονώδεις ασθένειες και αυτοανοσία.

Τα Th2 T κύτταρα σχετίζονται με τη χυμική ανοσία. Σε αντίθεση με τα Th1 T κύτταρα που εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, τα Th2 κύτταρα οδηγούν στη έκφραση νευροτροφικών παραγόντων. Η έκκριση κυτταροκινών από τα Th2 κύτταρα (πχ. IL-4, IL-13) περιορίζει τη δράση των Th1 και Th17 κυττάρων. Έχει ανακαλυφθεί μία νέα ομάδα κυττάρων, τα Th17 CD4⁺ T κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται παρουσία IL-6, IL-1 και IL-23 και παράγουν τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL17A και IL17E, οι οποίες φαίνεται να συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα φλεγμονών και αυτοάνοσων νοσημάτων.

Τα Th T κύτταρα ταξινομούνται κυρίως με βάση την παραγωγή κυτταροκινών²⁰⁰. Ο υποπληθυσμός Th1 εκκρίνει IL-2, IFN-γ και TNF-α και οδηγεί σε παραγωγή αντισωμάτων που οψώνίζουν και καθιλώνουν το συμπλήρωμα, ενεργοποιούν τα

μακροφάγα, ασκούν κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα και επιβραδυνόμενου τύπου υπερευαισθησία, ενώ ο υποπληθυσμός των Th2 λεμφοκυττάρων παράγει IL-4, IL-5, και συχνά IL-6, IL-9, IL-10 και IL-13, μεσολαβώντας τη χυμική ανοσία και τις αλλεργικές αποκρίσεις ²⁰¹. Εάν δεν υπάρχουν πολωτικά σήματα, τα CD4+ λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται ως Th0 λεμφοκύτταρα, τα οποία δεν έχουν ένα σαφώς διαφοροποιημένο προφίλ κυτταροκινών, και αντιπροσωπεύουν έναν ετερογενή πληθυσμό με συγκεκριμένους κλώνους που μπορούν να διαφοροποιηθούν είτε στην Th1 είτε στην Th2 οδό ως απάντηση σε εξωτερική διέγερση ^{202,203,204}.

Οι Th1 κυτταροκίνες επάγουν την Th1 απόκριση και αναστέλλουν την Th2 απόκριση και αντίστροφα ²⁰⁵. Σε κάθε απόκριση οι διαφορετικές λειτουργίες εξαρτώνται από τις διαφορές στις κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα Th1 και Th2 λεμφοκύτταρα: τα Th1 λεμφοκύτταρα παράγοντας IFN-γ ενεργοποιούν τα CD8+ T λεμφοκύτταρα και μακροφάγα και προάγουν την κυτταρική ανοσία ²⁰⁶, ενώ τα Th2 λεμφοκύτταρα διεγείρουν τη σύνθεση IgM, IgG1 και IgE από τα B λεμφοκύτταρα και ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα προάγοντας τις αντιδράσεις υπερευαισθησίας μέσω παραγωγής IL-4 και IL-5.

Πολλά CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα εκκρίνουν ένα φάσμα κυτταροκινών παρόμοιο με αυτό των Th1 κυττάρων και ονομάζονται Tc1 λεμφοκύτταρα, είτε συνθέτουν κυτταροκίνες τύπου Th2 και ονομάζονται Tc2 λεμφοκύτταρα. Η διαφοροποίηση των CD8+ μπορεί να επηρεασθεί από το συνδυασμό των κυτταροκινών των CD4+ λεμφοκυττάρων (η IFN-γ και η IL-12 προάγουν τη δημιουργία Tc1 κυττάρων, ενώ η IL-4 τη δημιουργία Tc2), ενώ τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα συσχετίζονται συνήθως με Th1 αποκρίσεις και δρουν σπανιότερα παρουσία Th2 λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, τόσο τα Tc1 όσο και τα Tc2 λεμφοκύτταρα μπορούν να είναι κυτταροτοξικά και να λύουν τα κύτταρα-στόχους μέσω μηχανισμού που εξαρτάται από ασβέστιο και την περφορίνη ²⁰⁷.

1.6 Το ζωικό πρότυπο των μυών (ποντικών)

Οι ποντικοί ως πειραματικό ζωικό πρότυπο συγκεντρώνουν μια σειρά από πλεονεκτήματα, παρουσιάζουν όμως και ορισμένα μειονεκτήματα και σημαντικές διαφορές με τον ανθρώπινο οργανισμό, που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την παθοφυσιολογική ερμηνεία νοσημάτων και

φαινομένων. Ένα σημαντικό γεγονός είναι ότι ο προσδοκώμενος χρόνος επιβίωσης των ποντικών είναι κατά μέσο όρο 2 έτη, ενώ του ανθρώπου 75 έτη περίπου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γενετικό υπόβαθρο των ζωικών μοντέλων ποντικών με ανοσοανεπάρκεια, Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficient (NOD/SCID). Πρόκειται για διασταύρωση των scid CB-17 αιμομικτικών ποντικών με σημειακή μετάλλαξη στο χρωμόσωμα 16 με τα non-obese diabetic (NOD) ποντίκια ²⁰⁸. Εμφανίζεται υπολειπόμενη κληρονομικότητα που δεν επιτρέπει την παραγωγή λειτουργικής Prkdc κινάσης. Το δυσλειτουργικό ένζυμο δεν επιτρέπει τον παραγωγικό ανασυνδυασμό V(D)J, με αποτέλεσμα τα B και T λεμφοκύτταρα των ζώων να μην ωριμάζουν. Χαρακτηριστικά του ζώου είναι η ανεπάρκεια ανοσολογικών λειτουργιών που μεσολαβούνται από τα B και T λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) και τα φυσικά φονικά (NK) κύτταρα. Στα ποντίκια αυτά, οι λειτουργίες του συστήματος του συμπληρώματος παραμένουν ανεπηρέαστες.

Το βασικό μειονέκτημα των ενήλικων ποντικών είναι το μικρό τους μέγεθος και σωματικό βάρος, περίπου 30 γραμμάρια, το οποίο δημιουργεί προβλήματα στους χειρουργικούς χειρισμούς και στην *in vivo* απεικόνιση. Παρόλα αυτά με την ανάπτυξη νεότερων τεχνικών και συσκευών το πρόβλημα του μεγέθους των πειραματοζώων δείχνει προοδευτικά να ξεπερνιέται.

Όσον αφορά τα πλεονεκτήματα της χρήσης των ποντικών σε πειραματικές εργασίες περιλαμβάνουν κυρίως τις απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (π.χ. δίαιτα), κάτι το οποίο είναι αδύνατο σε μακροχρόνιες κλινικές μελέτες. Επιπρόσθετα, στον ανθρώπινο πληθυσμό είναι αδύνατη η στοχευμένη μελέτη γενετικών αλλαγών και η παρατήρηση της επακόλουθης επίπτωσή τους σε συγκεκριμένες παθογόνες διαταραχές.

Με τη χρήση όμως πειραματοζώων και τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής, τέτοιου είδους μελέτες είναι εφικτές παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες ²⁰⁹. Στο γεγονός αυτό συμβάλλει και η πληθώρα διαφορετικών φυλών ποντικών τα οποία προήλθαν από διασταυρώσεις γενετικά τροποποιημένων πειραματοζώων σε διάφορους συνδυασμούς.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα των πειραματικών μελετών με ποντίκια είναι ότι η

δημιουργία μίας πειραματικής αποικίας είναι μια εύκολη διαδικασία χάρη στο μεγάλο αριθμό των απογόνων μετά από κάθε κυοφορία (4-6) και το σύντομο χρονικό διάστημα επανάληψης των κύκλων αναπαραγωγής. Κάθε κύκλος απαιτεί συνολικά 9 εβδομάδες, δηλαδή 3 εβδομάδες γαλουχίας και 6 εβδομάδες για τη γενετήσια ωρίμανση, ενώ και η ανάπτυξη αθηρωμάτωσης γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Τέλος, είναι σχετικά εύκολο να συντηρούνται μεγάλες πληθυσμιακές αποικίες ποντικών στο εργαστήριο, αφού δεν απαιτείται μεγάλος χώρος συγκριτικά με άλλα ζωικά πρότυπα.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Σκοπός της μελέτης

Οι στόχοι της μελέτης διαμορφώθηκαν ως εξής:

A) Η μελέτη της έκφρασης και της δραστηριότητας των κυτταροκινών κατά τη διάρκεια χειρουργικής φλεγμονής στο πίσω άκρο ανοσοανεπαρκών και αγρίου τύπου ποντικών.

B) Η μελέτη και απεικόνιση της επαγόμενης αγγειογένεση σε ανοσοανεπαρκή και αγρίου τύπου πειραματόζωα.

Γ) Η μελέτη της έκφρασης και της δραστηριότητας των κυτταροκινών υπό την επίδραση σιλοσταζόλης κατά τη διάρκεια χειρουργικής φλεγμονής στο πίσω άκρο ανοσοανεπαρκών και αγρίου τύπου ποντικών.

Δ) Η μελέτη και απεικόνιση της επαγόμενης αγγειογένεσης υπό την επίδραση σιλοσταζόλης σε ανοσοανεπαρκή και αγρίου τύπου πειραματόζωα.

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Συνολικά στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 108 NOD.CB17-Prkdcscid/J και 108 CB17 αρσενικοί ποντικοί. Την 8η εβδομάδα ζωής των πειραματόζων ορίστηκε η έναρξη του πρωτοκόλλου μελέτης, οπότε και τα ποντίκια τυχαιοποιήθηκαν στις παρακάτω ομάδες:

Για τα ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια NOD.CB17-Prkdcscid/J:

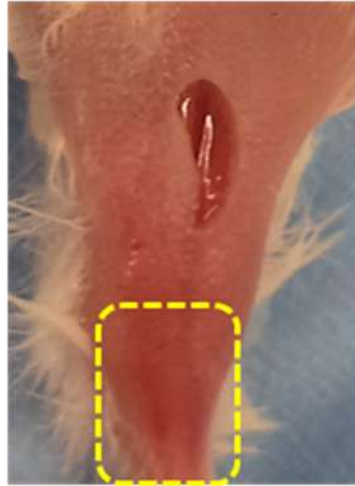
- **Ομάδα Nisch (n=54):** Πρόκληση ισχαιμίας
- **Ομάδα CiNisch (n=54):** Πρόκληση ισχαιμίας και ακολούθως χορήγηση σιλοσταζόλης

Για τα ποντίκια αγρίου τύπου CB17:

- **Ομάδα Bisch (n=54):** Πρόκληση ισχαιμίας
- **Ομάδα CiBisch (n=54):** Πρόκληση ισχαιμίας και ακολούθως χορήγηση σιλοσταζόλης.

Ακολούθησε σήμανση και αρίθμηση των ποντικών κάθε κλωβού και ζύγιση του σωματικού βάρους με τη βοήθεια ηλεκτρονικού ζυγού.

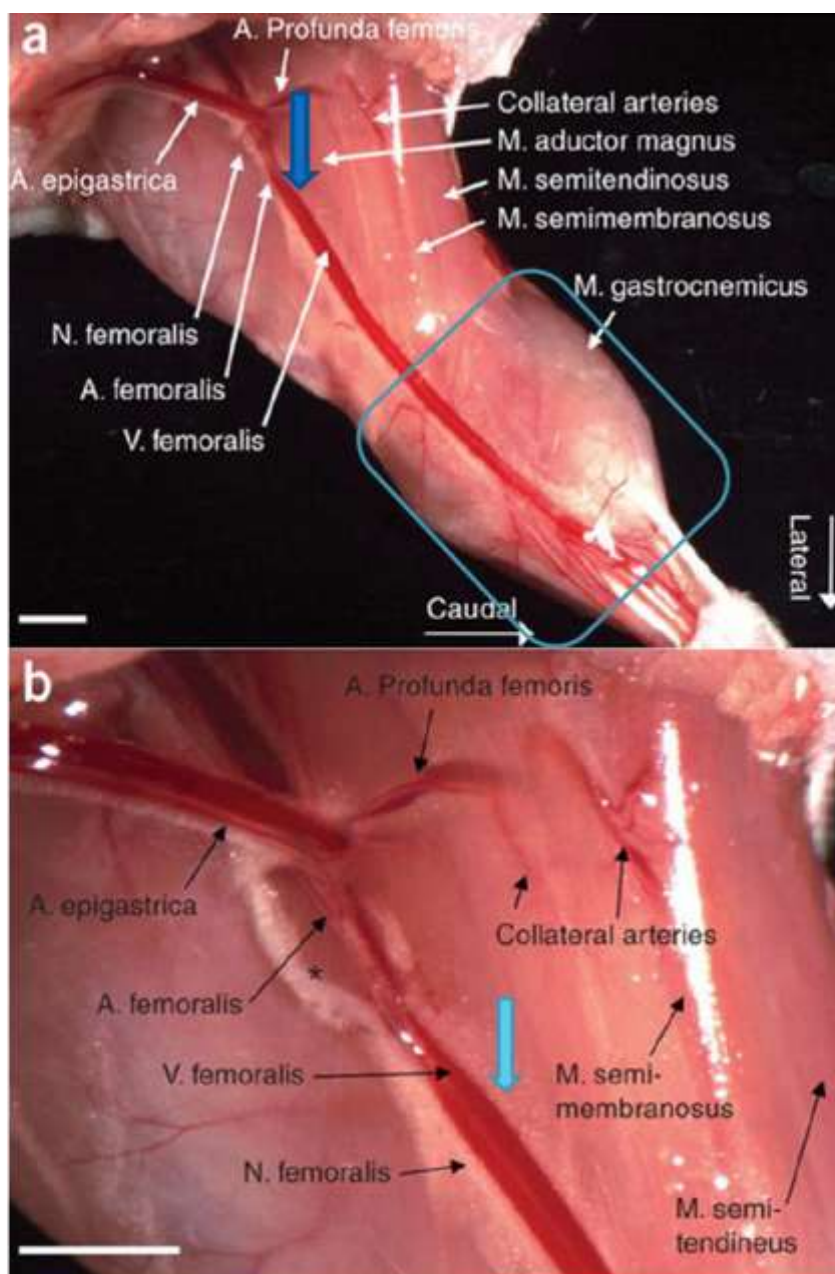
Όλα τα ζώα υποβλήθηκαν σε ισχαιμία οπίσθιου άκρου υπό γενική αναισθησία, η οποία επιτεύχθηκε με χορήγηση 2% ισοφλουρανίου (IsoFlo®, Abbott, USA). Πραγματοποιήθηκε μικρή τομή στο δέρμα στη δεξιά περιοχή της βουβωνικής χώρας (Εικ. 8) και η μηριαία αρτηρία αποκαλύφθηκε και παρασκευάστηκε.



Εικόνα 8. Τομή στη δεξιά περιοχή της βουβωνικής χώρας του χειρουργημένου μυός. Ο γαστροκνήμιος μύς περιγράφεται με την κίτρινη γραμμή.

Στη συνέχεια η μηριαία αρτηρία διαχωρίστηκε από το νεύρο και τη φλέβα και επιλέχθηκε το σημείο τομής της αρτηρίας με χρήση διαθερμίας (Εικ. 9). Η χρήση διαθερμίας είχε ως αποτέλεσμα την τομή, μόνιμη απόφραξη και πλήρη έμφραξη της δεξιάς μηριαίας αρτηρίας. Το εγγύς άκρο της αρτηρίας μετακινήθηκε εγγύτατα προς τον περιβάλλοντα ιστό και το απομακρυσμένο άκρο μετατοπίστηκε απομακρυσμένα, δημιουργώντας μια απόσταση $2,1 \pm 0,8$ mm μεταξύ των δύο άκρων του αγγείου.

Στη συνέχεια ακολούθησε η συρραφή του τραύματος με ράμμα Vicryl W9443. Το τραύμα και η γύρω περιοχή καθαρίστηκαν εκ νέου με φυσιολογικό ορό, η γραμμή συρραφής εμποτίστηκε με ιωδιούχο ποβιδόνη και το τραύμα έκλεισε. Τα ζώα τοποθετήθηκαν σε ζεστό και καθαρό κλουβί, παρακολουθήθηκαν για 2 ώρες και στη συνέχεια επέστρεψαν στο θάλαμό τους.



Εικόνα 9 α. Σημείο διαχωρισμού με διαθερμία στην κοινή μηριαία στη δεξιά περιοχή της βουβωνικής χώρας του χειρουργημένου μυός. **Εικόνα 9 β.** Μεγέθυνση του σημείου τομής

2.2 Χορήγηση σιλοσταζόλης

Στα ζώα των πειραματικών ομάδων έγινε καθημερινά και για χρονικό διάστημα 7 ημερών χορήγηση εναιωρήματος σιλοσταζόλης σε HPMC με διοισοφάγειο καθετήρα και απευθείας έγχυση της φαρμακευτικής ουσίας στο στομάχι των πειραματόζων. Την ημέρα της χειρουργικής επέμβασης (D0) χορηγήθηκαν 60 mg/kg σιλοσταζόλης

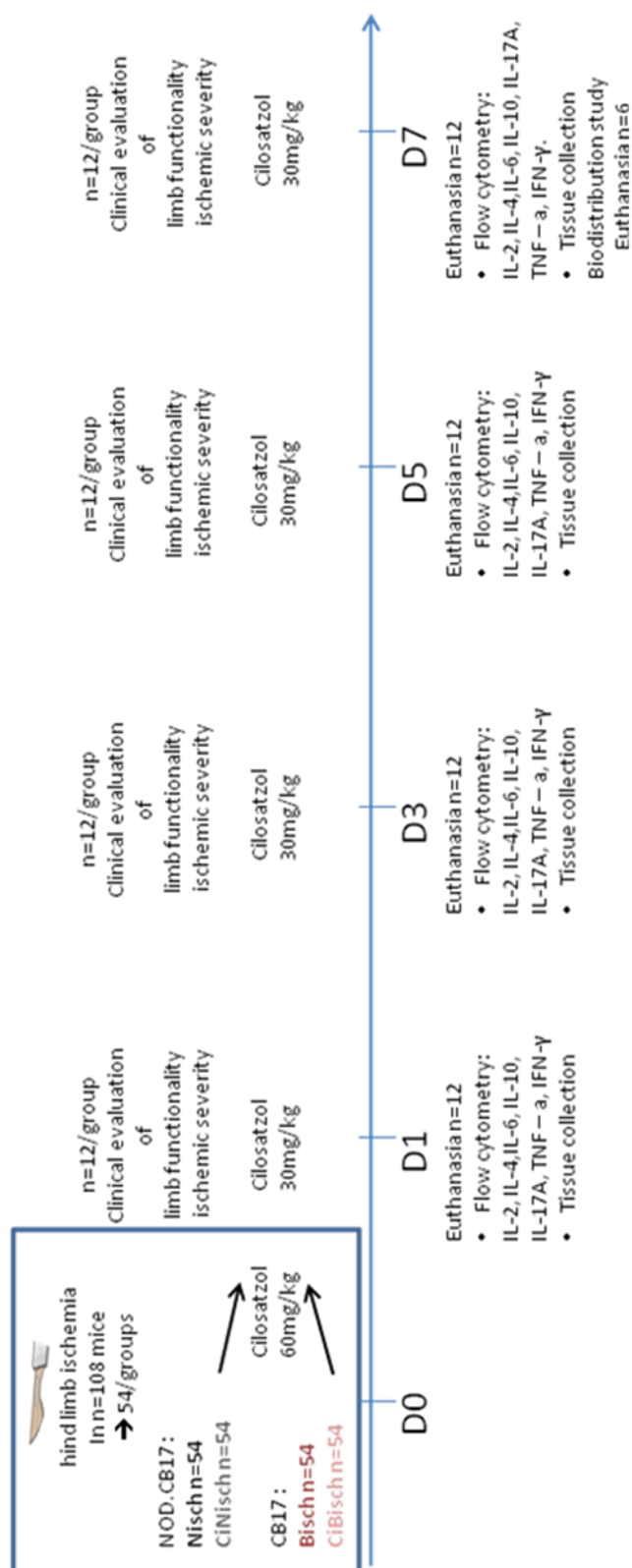
(Cilostazol HY-17464, MedChemtronica, Στοκχόλμη, Σουηδία) σε όλα τα ζώα των ομάδων CiNisch και CiBisch μέσω του διοισοφάγειου καθετήρα.

Η ημερήσια δόση καθορίστηκε στα 30 mg/kg σωματικού βάρους, και χορηγείτο εφάπαξ. Το εναιώρημα δραστικής ουσίας παρασκευαζόταν καθημερινά και η χορήγηση πραγματοποιείτο εντός 5 λεπτών από την παρασκευή του. Η συγκέντρωση του εναιωρήματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 3 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, στα πειραματόζωα των υπόλοιπων ομάδων έγινε διοισοφάγεια χορήγηση 0,3 mL φυσιολογικού ορού ανά συνεδρία.

Τα ζώα συνέχισαν να λαμβάνουν ημερήσια δόση σιλοσταζόλης 30 mg/kg για τις επόμενες 7 μετεγχειρητικές ημέρες (D1 - D7) (Εικ. 10).

Σε κάθε μετεγχειρητική ημέρα D1, D3, D5, και D7 δώδεκα (12) ποντικοί αξιολογήθηκαν μακροσκοπικά για τη λειτουργικότητα των άκρων τους και την σοβαρότητα της προκληθείσας ισχαιμίας. Για τους σκοπούς της λειτουργικότητας, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία κάθετης δοκού για να εξεταστεί η ικανότητα του ζώου ως προς την κάθετη κίνηση. Επιπλέον, την ημέρα D7, διεξήχθη μελέτη βιοκατανομής στην οποία συμμετείχαν οι υπόλοιποι έξι (6) ποντικοί της ομάδας, όπως περιγράφεται παρακάτω. Η ευθανασία των πειραματόζωων έγινε, μετά την ολοκλήρωση της αξιολόγησης, 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 μl). Ο γαστροκνήμιος μυς (Εικ. 8) αφαιρέθηκε χειρουργικά και εμβαπτίστηκε σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% για μονιμοποίηση και περαιτέρω ιστολογική ανάλυση.

Σε διάστημα μικρότερο των 30 min από τη λήψη του αίματος ακολούθησε φυγοκέντρηση του αίματος στις 8000 στροφές/min για διάστημα 15 min στους 6°C. Ο ορός του αίματος διαχωρίστηκε και τοποθετήθηκε σε πλαστικά φιαλίδια τα οποία έφεραν κωδική ονομασία, ξεχωριστά για κάθε ποντικό. Τα φιαλίδια αυτά αποθηκεύτηκαν άμεσα σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) και η απόψυξή τους έγινε μόνο μία φορά, την ημέρα των αναλύσεων.



Εικόνα 10. Διαγραμμα περιβαματικού σχεδιασμού

Για ελαχιστοποίηση των μεταβλητών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων λόγω των πειραματικών χειρισμών, έγιναν εικονικές παρεμβάσεις σε όλες τις πειραματικές ομάδες αντίστοιχες με αυτές των ομάδων στις οποίες έγινε κανονική παρέμβαση. Συγκεκριμένα, στα ζώα πειραματισμού των ομάδων στις οποίες δεν χορηγήθηκε σιλοσταζόλη (Nisch και Bisch) πραγματοποιήθηκε σε καθημερινή βάση διοισοφάγεια χορήγηση φυσιολογικού ορού ίσου όγκου με τον όγκο του χορηγούμενου εναιωρήματος σιλοσταζόλης στις άλλες ομάδες. Το βάρος των πειραματόζων προσδιορίστηκε σε κάθε μία από τις 4 εξεταζόμενες μετεγχειρητικές ημέρες D1, D3, D5, και D7, με την τελευταία να συμπίπτει με το πέρας της μελέτης.

Στην παρούσα μελέτη αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε κάθε μία από τις 4 εξεταζόμενες μετεγχειρητικές ημέρες D1, D3, D5, και D7. Σε κάθε ομάδα πραγματοποιήθηκαν 2 αιμοληψίες η πρώτη κατά την έναρξη του πειραματισμού κατά τη διάρκεια του χειρουργείου και η δεύτερη, η καρδιοπαρακέντηση προκαλούσε και την ευθανασία του ποντικού. Η δεύτερη αιμοληψία της κάθε ομάδος πραγματοποιήθηκε μετά από 8/ωρη νηστεία των ποντικών και με τη χρήση ήπιας αναισθησίας με εισπνεόμενο ισοφλουράνιο μέσα σε ειδική συσκευή. Έγινε κατάλληλη παρακέντηση της αριστεράς κοιλίας της καρδιάς για τη λήψη της μέγιστης δυνατής ποσότητας ολικού αίματος από αυτή (700-1000 μ l) και ακολούθησε ευθανασία των ποντικών με την παροχή υψηλής ποσότητας αναισθητικού ισοφλουρανίου.

Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν χειρουργικά ο γαστροκνήμιος μυς και από τα δύο πίσω άκρα από κάθε ζώο της ομάδας. Από τα ιστολογικά δείγματα απομακρύνθηκαν το λίπος και ο συνδετικός ιστός, στο βαθμό που αυτό ήταν εφικτό, και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10%. Στην υγρή αυτή μορφή διατηρήθηκαν μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση.

2.3 Εργαστηριακές συνθήκες

Κατά τη διάρκεια διαμονής των ποντικών στη Μονάδα Πειραματόζων 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 12/ωρος ημερήσιος φωτισμός ακολουθούμενος από 12/ωρο 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 τα ζώα (H-TempTM polysulfone type III open top cages, Tecniplast, Milan, Italy) ήταν χωρητικότητας 6 ζώων (τοποθετήθηκαν σε ομάδες των 5 ποντικών 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). με υπεύθυνο της Μονάδας Ζωικών Προτύπων τον Δρ. Νικόλαο Κωστομητσόπουλο. Στο Κέντρο 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). Το πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή είχε την έγκριση της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Νομαρχίας Αθηνών (υπ' αριθμ. απόφαση 6653/17-12-2015).

2.4 Πειραματικό πρότυπο: Κλινική αξιολόγηση της ισχαιμίας

Κατά τη διάρκεια των ημερών D1, D3, D5, και D7 το ισχαιμικό άκρο αξιολογήθηκε μακροσκοπικά χρησιμοποιώντας βαθμολογημένες κλίμακες μορφολογίας για τη νεκρωτική περιοχή και τροποποιημένη βαθμολογία ισχαιμίας ως εξής:

α) Διαβάθμιση βαθμολογίας για τη νέκρωση:

0 = απουσία νέκρωσης,

I = νέκρωση που περιορίζεται στα δάκτυλα των ποδιών (απώλεια δακτύλων),

II = νέκρωση που επεκτείνεται στην άνω επιφάνεια του ποδιού (dorsum pedis),

III = νέκρωση που εκτείνεται στο μηρό (ολική απώλεια οπίσθιου άκρου).

β) Διαβάθμιση βαθμολογίας για την ισχαιμία:

0 = απουσία νέκρωσης.

1 = αποχρωματισμός ενός νυχιού,

2 = αποχρωματισμός δύο ή περισσότερων νυχιών,

3 = αποχρωματισμός ενός δακτύλου,

4 = αποχρωματισμός δύο ή περισσότερων δακτύλων,

5 = νέκρωση του πέλματος,

6 = νέκρωση του ποδιού,

7 = αυτόματος ακρωτηριασμός του ποδιού.

Η αξιολόγηση της λειτουργικότητας του άκρου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος βαθμολόγησης Tarlov²¹⁰ κατά τις ίδιες ημέρες σύμφωνα με το ακόλουθο σύστημα ταξινόμησης:

0 = καμία κίνηση,

1 = ελάχιστα αντιληπτή κίνηση, χωρίς υποστήριξη του βάρους,

2 = συχνή και έντονη κίνηση, χωρίς υποστήριξη του βάρους,

3 = υποστήριξη του βάρους, μπορεί να προχωρήσει 1 ή 2 βήματα,

4 = περπάτημα με ήπιο έλλειμμα,

5 = κανονικό αλλά αργό περπάτημα,

6 = πλήρες και γρήγορο περπάτημα.

Για την ανίχνευση κινητικών ελλειμμάτων λόγω πιθανής δυσλειτουργίας που προκλήθηκε από την ισχαιμία, η δοκιμασία της καθέτου δοκού διεξήχθη κατά τις προαναφερθείσες ημέρες²¹¹.

Η δοκιμασία της καθέτου δοκού είναι ένα συμπεριφορικό τεστ που χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει το κινητικό έλλειμμα μετά από πρόκληση εγκεφαλικού. Οι

ποντικοί τοποθετήθηκαν με το κεφάλι προς τα άνω, στην κορυφή μιας κατακόρυφης δοκού τραχείας επιφάνειας (διάμετρος 8 mm, ύψος 55 cm) και ο λανθάνον χρόνος καθόδου (χρόνος κινητικής δραστηριότητας, TLA) βαθμολογήθηκε για τρεις δοκιμές²¹². Για να αποφευχθεί το «γλίστρημα» των ζώων η επιφάνεια της δοκού δεν ήταν ολισθηρή. Η χρονομέτρηση ξεκινούσε όταν το ζώο σταθεροποιείτο στην κορυφή της δοκού και σταματούσε όταν και τα 4 πόδια του ακουμπούσαν το πάτωμα.

2.5 Ανάλυση κυτταροκινών - Κυτταρομετρία ροής συστοιχίας σφαιριδίων (CBA)

Η ανάλυση κυτταροκινών έγινε χρησιμοποιώντας το κιτ BD™ Mouse Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, California) το οποίο επέτρεψε την ταυτόχρονη ανίχνευση των IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ και IL-17A. Τα δείγματα ορού αποψύχθηκαν και αραιώθηκαν με το διαλύτη της ανάλυσης (1:2 v/v) και η ανάλυση CBA διεξήχθη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρότυπο διάλυμα κάθε κυτταροκίνης αραιώθηκε σειριακά για να διευκολυνθεί η κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης, απαραίτητες για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των πειραματικών δειγμάτων. Τέλος, τα επικαλυμμένα σφαιρίδια με Abs ειδικά για τις προαναφερθείσες κυτταροκίνες, αναμείχθηκαν.

Μετά την καθιέρωση πρότυπων καμπυλών, προστέθηκαν 50 μ L του μίγματος των σφαιριδίων σύλληψης σε 50 μ L δείγματος ορού. Προστέθηκαν 50 μ L αντισώματος ανίχνευσης συζευγμένου με φυκοερυθρίνη στο μίγμα σφαιριδίων συλλογής δείγματος και το τελικό μίγμα επώαστηκε για 3 ώρες στο σκοτάδι, με περιστασιακή ανάδευση. Τα δείγματα εκπλύθηκαν με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (200 x g, 5 λεπτά) και το ίζημα επαναωρήθηκε σε 300 μ L ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. 200 μ L από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλαστικά σωληνάρια και αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής τύπου FACS CANTO II. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό FCAP Array Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Οι πληθυσμοί των σφαιριδίων και η μέση ένταση φθορισμού (MFI) για κάθε κυτταροκίνη στο κάθε δείγμα υπολογίστηκαν αυτόματα. Κάθε σφαιρίδιο κυτταροκίνης μετρήθηκε 200 φορές πριν τον υπολογισμό της μέσης τιμής MFI. Οι MFI των πειραματικών δειγμάτων τοποθετήθηκαν στη συνέχεια στη λογιστική εξίσωση των καμπυλών αναφοράς 5-παραμέτρων για να υπολογιστεί η συγκέντρωση των κυτταροκινών στα πειραματικά δείγματα στα οποία τελικά ενσωματώθηκε και ο παράγοντας αραιώσης. Κάθε δείγμα αναλύθηκε σε τρία χωριστά πειράματα.

Προκειμένου να διασφαλιστεί η ακρίβεια/εγκυρότητα των δεδομένων, μετρήθηκαν επίσης τα επίπεδα κυτταροκινών μετά τη βαθμονόμηση του οργάνου με σωματίδια SPHERO 8-peak Rainbow Particles. Επιπλέον, πρότυπα δείγματα κυτταροκινών γνωστής συγκέντρωσης αναλύθηκαν παράλληλα με τα δείγματα, για να επιτραπεί η ποσοτική τους ανάλυση.

2.6 Βιοχημικές Ραδιοσήμανση του NODAGA-c(RGDfK) με γάλλιο-68

Το γάλλιο-68 εκλούστηκε από τη γεννήτρια $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ με 7 mL HCl 0,1 N και παγιδεύτηκε σε όξινη κατιοντοανταλλακτική ρητίνη. Τα μεταλλικά προϊόντα αποικοδόμησης (όπως Zn, Fe, Ti και Ge) απομακρύνθηκαν με πέρασμα 1 mL διαλύματος έκπλυσης που περιείχε ακετόνη (80% v/v) και 0,15 M HCl (20% v/v) ²¹³. Η επακόλουθη εκρρόφηση καθαρού γαλλίου-68 από τον ανταλλάκτη κατιόντων αποδόθηκε με 400 μL ακετόνης (97,6% v/v) και 0,15 M HCl (2,4% v/v). Για ένα τυπικό παρασκεύασμα NODAGA-RGDfK σημασμένου με γάλλιο-68, αναμίχθηκαν 50 μL (1 mg/mL αποθεματικό διάλυμα σε υπερκάθαρο H_2O , 50 $\mu\text{g}/52$ nmol) NODAGA-RGDfK με 350 μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (0,2 mol/L, pH 4) και 100 μL εκλούσματος γαλλίου-68 (~50 MBq). Το μίγμα στη συνέχεια επωάστηκε για 15 λεπτά στους 90°C. Για τον ποιοτικό έλεγχο της ραδιοσήμανσης δείγματα 10 μL του διαλύματος αντίδρασης αναλύθηκαν με RP-HPLC, εφαρμόζοντας σύστημα γραμμικής διαβάθμισης με ρυθμό ροής 1 mL/min από 0% B έως 100% B σε 20 λεπτά, όπου ο διαλύτης A = 0,1% TFA σε H_2O και ο διαλύτης B = 0,1% TFA σε AcN. Το ραδιοσημασμένο σύμπλοκο χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το διάλυμα ραδιενεργού ιχνηθέτη για τις μελέτες βιοκατανομής παρασκευάστηκε με αραίωση με ενέσιμο ύδωρ σε τελικό όγκο 1,5 mL.

Η ραδιοχημική καθαρότητα του ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK όπως προσδιορίστηκε με RP-HPLC ήταν πάνω από 98%. Η ειδική δραστηριότητα του πεπτιδίου ^{68}Ga ήταν περίπου 1 GBq/ μmol . Διαπιστώθηκε ότι η αυξημένη θερμοκρασία ήταν απαραίτητη για την ποσοτική ραδιοσήμανση, λόγω της γεννήτριας $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ χαμηλής δραστηριότητας που χρησιμοποιήθηκε.

Το ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK χορηγήθηκε ενδοφλεβίως μέσω της φλέβας της ουράς. Κάθε ποντίκι έλαβε $2,0 \pm 0,5$ MBq/3,47 nmol/100 μL του μορίου αναφοράς απεικόνισης με σήμανση γαλλίου-68. Η μελέτη βιοκατανομής πραγματοποιήθηκε στα 30 λεπτά (n = 6 ποντικοί). Μετά το πείραμα, οι ποντικοί ευθανατώθηκαν με καρδιακή

παρακέντηση και η καρδιά, οι πνεύμονες, το ήπαρ, οι νεφροί, το στομάχι, το έντερο, ο σπλήνας, η ουρά και το αριστερό (έλεγχος) και το δεξί (χειρουργηθέν) πίσω άκρο αφαιρέθηκαν χειρουργικά, ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν σε μετρητή φρεατίων NaI (αυτόματος μετρητής γάμμα Packard COBRA II) (Εικ. 11).



Εικόνα 11. Αυτόματος μετρητής γάμμα Packard COBRA II

Όλες οι μετρήσεις διορθώθηκαν ως προς το υπόβαθρο και τη ραδιενεργό αποσύνθεση. Τα δεδομένα ιστικής κατανομής υπολογίστηκαν ως ποσοστό επί τοις εκατό της ενέσιμης δόσης ανά γραμμάριο (% ID/g)²¹⁴, χρησιμοποιώντας κατάλληλο πρότυπο. Το στομάχι και το έντερο δεν εκκενώθηκαν πριν από τις μετρήσεις. Το % ID στο ολικό αίμα εκτιμήθηκε υποθέτοντας έναν όγκο ολικού αίματος 6,5% του συνολικού σωματικού βάρους.

2.7 Παθολογοανατομική επεξεργασία – Μορφομετρική ανάλυση

Τμήμα από τον ιστό του γαστροκνημίου μυ που αφαιρέθηκε από τα πειραματόζωα εγκλείστηκε μέσα σε ειδικά πλαστικά καψίδια ιστολογίας, τα οποία 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 η μεθοδολογία έγκλεισής τους σε παραφίνη και την περαιτέρω έγκλειση των ιστών σε blocks μικροτόμου, που περιγράφεται παρακάτω:

- Έντονη έκπλυση από τη φορμαλίνη με νερό βρύσης για 10 min.
- Εμβάπτιση και παραμονή o/n σε διάλυμα αιθανόλης 70% στους 4°C.

- Αφυδάτωση με εμβάπτιση σε διαδοχικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης, 1 h/συγκέντρωση: 70 %, 80 %, 95 %, 100 %, 100 % σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- Υδροφοβοποίηση με εμβάπτιση σε ξυλένιο 100 % για 1 h σε RT (x2 φορές)
- Εμπότιση παραφίνης με εμβάπτιση σε υγρή παραφίνη για 1 h στους 60°C (x2)
- Έγκλειση σε blocks παραφίνης με χρήση καλουπιού και ψύξη στους -10°C.
- Αποθήκευση για τουλάχιστον 24 h στους -20°C (Πίνακας 1).

Από τα blocks παραφίνης έγινε λήψη τομών μικροσκοπίας (πάχους 5 μm) σε μικροτόμο (Leica RM2255 – Fully Automated Rotary Microtome, Leica Biosystems GmbH Wetzlar, Germany), σε αριθμημένες αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίας. Οι τομές τοποθετήθηκαν ακολουθώντας μοτίβο τέτοιο ώστε σε κάθε αντικειμενοφόρο να τοποθετούνται 3 τομές που απείχαν 50 μm η μία από την επόμενη, ενώ η πρώτη τομή κάθε αντικειμενοφόρου ήταν η επόμενη (5 μm απόσταση) από την πρώτη τομή της προηγούμενης αντικειμενοφόρου. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίστηκε η σωστή κατανομή των υπό μελέτη τομών ώστε ο μέσος όρος των μετρήσεων για κάθε χρώση να ανταποκρίνεται όχι σε σημειακή αλλά σε ευρύτερη μέτρηση.

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 διαφανείς 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 βάφουν διαφορετικά στοιχεία, και 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 παρατηρήσουμε πλήθος μορίων, πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές χρώσεις σε «γειτνιάζουσες» τομές, στοχεύοντας στον συνεντοπισμό των ανιχνευόμενων στοιχείων. Μέρος των τομών που ελήφθησαν από τον γαστροκνήμιο μυ των πειραματόζωων χρησιμοποιήθηκαν για την ιστοχημική χρώση των δειγμάτων και παρατήρηση των μορφομετρικών τους στοιχείων σε οπτικό μικροσκόπιο (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης).

Πίνακας 1: Συσκευές και υλικά κατά την 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	

Η παρατήρηση όλων των τομών έγινε σε διόφθαλμο οπτικό μικροσκόπιο φωτός (Olympus CX31, Hertfordshire, Olympus UK Ltd) σε μεγέθυνση 100X – 400X, ενώ όλες οι εικόνες ελήφθησαν με τη βοήθεια κάμερας Olympus DP20 η οποία ήταν προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο. Μέσω ειδικού μετατροπέα που έφερε η κάμερα (U-TV0, 5xC-3, N1512100) και ο οποίος ήταν συνδεδεμένος στον ηλεκτρονικό υπολογιστή κάθε εικόνα αποθηκευόταν ψηφιακά απευθείας σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για την αποθήκευση στον ηλεκτρονικό υπολογιστή και την ψηφιακή επεξεργασία των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρονικό πρόγραμμα Altras Soft Imaging System.

Τα ιστικά παρασκευάσματα αρχικά εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης (10%) για 24-48 ώρες και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε έγκλειστα παραφίνης κατάλληλα επεξεργασμένα, ώστε να μπορούν να ληφθούν τομές σε ιστοτόμο. Η καρδιά μαζί με το αορτικό τόξο, την ανιούσα αορτή και τις καρωτίδες από κάθε

ποντίκι τοποθετούνταν, χωρίς να διαχωριστούν μεταξύ τους, στο ίδιο έγκλειστο παραφίνης, ενώ η κοιλιακή αορτή μέχρι το διχασμό των λαγονίων αρτηριών τοποθετούνταν σε διαφορετικό έγκλειστο παραφίνης.

2.7.1 Χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης

Η χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (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 ηωσίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα.

Το πειραματικό πρωτόκολλο της H&E χρώσης περιγράφεται παρακάτω:

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

Νεκρωτικοί-λιπιδικοί πυρήνες εμφανίζονταν ως ακυτταρικές, κενотоπιώδεις περιοχές που στερούνταν κυτταροπλάσματος και πυρήνων²¹⁵.

2.7.2 Ανοσοϊστοχημεία - Αντισώματα

Η τεχνική αυτή της ανοσοϊστοχημείας βασίζεται στη δέσμευση ειδικών αντισωμάτων στα ιστικά αντιγόνα για την ποιοτική ταυτοποίηση αντιγόνων με οπτική μικροσκοπία. Στην παρούσα εργασία, για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών-στόχων, χρησιμοποιήθηκε έμμεση ανοσοϊστοχημεία (με χρήση δύο αντισωμάτων) με τη μέθοδο σχηματισμού συμπλόκου αβιδίνης-βιοτίνης. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου αυτής, που περιγράφηκε το 1981, εκμεταλλεύεται την ισχυρή τάση σύνδεσης της αβιδίνης (πρωτεΐνης που βρίσκεται στο λεύκωμα 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 της σταθερής περιοχής του πρωτογενούς αντισώματος, δεσμεύεται με τη σειρά του στις περιοχές όπου υπάρχει το πρωτογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα, φέρει επίσης το ένζυμο βιοτίνη. Σε ξεχωριστή αντίδραση, γίνεται συμπλοκοποίηση της αβιδίνης με ένα βιοτυλιωμένο ένζυμο (στην περίπτωση 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 παρουσία υποστρώματος 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, δηλ. 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: Mac-3 και CD31. Το μικρότερο πάχος τομών που χρησιμοποιήθηκαν σε χρώσεις ανοσοϊστοχημείας ήταν 7 μm . Η γενική μεθοδολογία για την ανοσοϊστοχημική χρώση περιγράφεται παρακάτω:

- Τήξη της παραφίνης με θέρμανση των αντικειμενοφόρων στους 60°C για 5 min.
- Αποπαραφινοποίηση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε 2 διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου 100% για 10 min έκαστο.
- Υδροφιλοποίηση, ξέπλυμα ξυλενίου με εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 5 min.
- 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 5 min.
- Αποκάλυψη επιτόπιων με εμβάπτιση σε ρυθμιστικό δ/μα κιτρικού οξέος 10 mM pH 6,0 Tween20 και βρασμό για 20 min.
- Σταδιακή ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 30 min).
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 6,0 για 5 min (x3)
- Εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με εμβάπτιση σε διάλυμα H₂O₂ 3 % σε PBS (άλλα πρωτόκολλα χρησιμοποιούν μεθανόλη) για 15 min στο σκοτάδι.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 6,0 για 5 min (x3)
- Δέσμευση 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 5 min (x3)

- Εφαρμογή βιοτινυλιωμένου δευτερογενούς αντισώματος για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 6,0 για 5 min (x3)
- Επώαση με το διάλυμα συμπλόκου στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (Streptavidin-HRP-conjugate), το οποίο δεσμεύεται από τη βιοτίνη του δευτέρου αντισώματος, για 15 min.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 6,0 για 5 min (x3)
- Προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος (AEC) ώστε να ξεκινήσει η ενζυματική αντίδραση της υπεροξειδάσης που οδηγεί σε 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% (30 sec), 95% (30 sec), 100% (1 min), 100% (2 min).
- Εμβάπτιση σε ξυλένιο 100% για 5 min (x2)
- Εφαρμογή μέσου επικάλυψης (DPX) με πουάρ κι επικάλυψη με καλυπτρίδα (με άσκηση πίεσης για απομάκρυνση φυσαλίδων και πλεονάζοντος DPX).
- Στέγνωμα για 24 h.

➤ **Αντίσωμα για το αντιγόνο των μακροφάγων (Mac-3).** Ο ποιοτικός έλεγχος της παρουσίας μακροφάγων στον αγγειακό ιστό έγινε με τη χρήση του κεκαθαρμένου Mac-3 μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού, κλώνος M3/84 (550292, BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ, USA) που είναι ειδικό για ανοσοϊστοχημική εξέταση ιστών. Πρόκειται για τον ισότυπο Rat [(Lewis x BN) F1] IgG1k και το αντίσωμα M3/84 αντιδρά με το αντιγόνο 110 kDa Mac-3 το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια μονοπύρηνων φαγοκυττάρων ποντικού ²¹⁶. Η έκφραση του γλυκοπρωτεϊνικού αυτού αντιγόνου αυξάνει κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων σε ενεργοποιημένα μακροφάγα ²¹⁷. Το M3/84 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 ²¹⁸. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το M3/84 αντίσωμα δίνει θετική χρώση σε δενδριτικά κύτταρα και στο ενδοθήλιο σε τομές θύμου αδένος, λεμφοαδένων, σπληνός και λεμφοειδούς ιστού από τον εντερικό σωλήνα. Σύμφωνα με τις

κατευθυντήριες οδηγίες του παρόχου, το αντίσωμα M3/84 είναι κατάλληλο για τομές παραφίνης και η διαδικασία χρώσης που χρησιμοποιείται θα πρέπει να είναι τριών βημάτων συνδυάζοντας πολλαπλώς απορροφούμενο βιοτινυλιωμένο anti-rat IgG_{1/2}, (550325), Streptavidin HRP, ως δευτερογενές αντίσωμα (550946) και σύστημα ανίχνευσης DAB (550880). Η συνιστώμενη αραιώση από τον κατασκευαστή είναι 1:10 έως 1:50, αλλά στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε έπειτα από ορισμένες δοκιμαστικές εργασίες ότι η καταλληλότερη αραιώση για την ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση ήταν 1:500 (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Υλικά κατά τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Είδος - Συσκευή	Κωδικός - Περιγραφή	Παραγωγός
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 HOC(COONa)(CH₂COONa)₂ · 2H₂O	W302600 - Sodium citrate dehydrate ≥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, ≥98%, pellets (anhydrous)	
Χλωριούχο κάλιο KCl	P9541 - Potassium chloride for molecular biology, ≥99,0%	
Όξινο φωσφορικό νάτριο Na₂HPO₄	S3264 - Sodium phosphate dibasic ≥98,5% (titration)	
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH₂PO₄	P9792 - Potassium phosphate monobasic ≥98,0%	
Tween20	P9416 - TWEEN® 20 viscous liquid	
Υπεροξειδίο του υδρογόνου H₂O₂	H3410 - Hydrogen peroxide solution, 30% wt. in H ₂ O	
Αιματοξυλίνη Mayer's	350604T - Haemalum (Mayer's) Gurr®	VWR Radnor, PA, USA

Πίνακας 3: Διαλύματα κατά τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.

Διάλυμα	Παρασκευή
Citrate buffer	<u>Για 1 L:</u> Διάλυση με ανάδευση σε 1000 mL ddH ₂ O 2,94 g sodium citrate (dihydrate). Ρύθμιση του pH στο 6,0 με διαδοχικές ρίψεις σταγόνων HCl 1N. Προσθήκη 0,5 mL Tween20 κι ανάδευση.
PBS	<u>Για 1 L 10x stock solution:</u> Διάλυση με καλή ανάδευση σε 800 mL ddH ₂ O, 80 g NaOH, 2 g KCl, 4,4 g Na ₂ HPO ₄ και 2,4 g 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 1 L με ddH ₂ O. Πριν τη χρήση, αραίωση 1/10 με ddH ₂ O.
Διάλυμα H₂O₂ σε PBS	Για 250 mL: Διάλυση 12,5 mL H ₂ O ₂ 30% σε 237,5 mL PBS.
HCl 1N	Για 120 mL: Διάλυση 10 mL πυκνού HCl σε 110 mL ddH ₂ O
NaOH 1N	Για 100 mL: Διάλυση 5,844g NaOH σε 100 mL ddH ₂ O

Αντίσωμα για τον CD31 υποδοχέα.

1. Θέρμανση των αντικειμενοφόρων για 5-15 min στους 60°C
2. Αποπαραφινοποίηση με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε 2 διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου 100% για 10 min έκαστο.
3. Υδροφιλοποίηση, ξέπλυμα ξυλενίου με εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 2 min.
4. Υδροφιλοποίηση, ξέπλυμα ξυλενίου με εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% για 2 min.
5. Υδροφιλοποίηση, ξέπλυμα ξυλενίου με εμβάπτιση σε αιθανόλη 90% για 2 min.
6. Υδροφιλοποίηση, ξέπλυμα ξυλενίου με εμβάπτιση σε αιθανόλη 70% για 2 min.
7. Εμβάπτιση σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 6,0 για 2 min (x1) PBS.
8. Ανάκτηση αντιγόνου με Protease K, 1:500 με pH 8,0 για 15 min σε 37°C, και στη συνέχεια αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
9. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 6,0 για 5 min (x3).
10. Επώαση σε 2% H₂O₂ (σε PBS) για 30 min (stock 30%)
11. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 6,0 για 5 min (x3)
12. Blocking με 2% κανονικό goat serum (in PBS –Triton X 0,2%) για 30 min
13. Επώαση με rat anti-CD31 (BD 550274), **1:50** διάλυση σε 2% κανονικό goat serum -PBS –Triton X 0,2%) ο/η στους 4°C, και μετά για 30 min στους 37°C
14. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 3X10 min.

15. Προσθήκη Δευτερογενούς αντισώματος, polyclonal rabbit anti-rat immunoglobulins/HRP (Dako, cat number P0450) σε διάλυση 1:200, για 60 min
16. Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 3X10 min.
17. Προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος DAB (DAKO K3468) σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή και λήξη της αντίδρασης με τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων σε PBS.
18. Εμβάπτιση σε φιλταρισμένο διάλυμα αιματοξυλίνης Mayers για 30 sec
19. Έκπλυση με dH₂O δύο φορές
20. Αφυδάτωση σε 70% EtOH για 2 min, 90% EtOH για 2 min, 100% EtOH για 2 min δύο φορές.
21. Εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων 2 φορές σε διάλυμα ξυλενίου 100% για 5min.

2.7.3 Μορφομετρική ανάλυση

Όλες οι τομές που υπέστησαν χρώση (12 μύες ανά ομάδα), 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 μεγεθύνσεις 10x, 20x και 40x. Οι ψηφιακές φωτογραφίες έπειτα αναλύθηκαν από ειδικό λογισμικό ψηφιακής ανάλυσης εικόνας προς εξαγωγή δεδομένων.

2.7.3.1 Μορφομετρική ανάλυση χρώσης H&E

Οι εικόνες από τη χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της φλεγμονής στον χειρουργημένο γαστροκνήμιο μυ. Όλες οι τομές παρατηρήθηκαν με μεγέθυνση 10x, 20x, 40x σε οπτικό μικροσκόπιο (Leica DM LS2, Wetzlar, Germany) και ψηφιακές εικόνες αποκτήθηκαν και αποθηκεύτηκαν χρησιμοποιώντας κάμερα μικροσκοπίου Leica DC 500 (Heerbrugg, Switzerland) και το λογισμικό «Altras Soft Imaging System». Όλες οι παρατηρήσεις και η βαθμολόγηση του χειρουργημένου άκρου στις ημέρες D1, D3, D5 και D7 πραγματοποιήθηκαν σε 3 τομές ανά μυ από έναν ερευνητή «τυφλό» ως προς το ερευνητικό πρωτόκολλο. Πέντε περιοχές, με φλεγμονώδη διήθηση, σε κάθε τομή φωτογραφήθηκαν με έναν 20× αντικειμενικό φακό (μεγέθυνση: 200×). Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση βασίστηκε στην ερευνητική εργασία των Akdemir και συνεργατών²¹⁹ και η διήθηση των λευκοκυττάρων βαθμολογήθηκε ως εξής:

0 = κανονική,

1 = ελαφρά διήθηση,

2 = έντονη διήθηση

3 = μαζική διήθηση.

Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση.

2.7.3.2 Μορφομετρική ανάλυση Ανοσοϊστοχημικών Χρώσεων

Οι σχετικές συγκεντρώσεις των Mac-3 και CD31 μετρήθηκαν στις τομές του γαστροκνημίου μυός. Έχοντας σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα την πρώτη τομή ως

negative control μετρήθηκε τόσο η θετική χρώση υποβάθρου όσο και το θετικό σήμα που έδωσαν οι αντιδράσεις των αντισωμάτων. Με απλή αφαίρεση του μέσου ποσοστού υποβάθρου-σήματος, υπολογίστηκε το θετικό σήμα κάθε δείγματος.

Πίνακας 4: 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

2.8 Στατιστική ανάλυση

Οι ποσοτικές μεταβλητές συνοψίστηκαν χρησιμοποιώντας μέσους όρους και τυπικές αποκλίσεις (standard deviation). Έγινε έλεγχος για την κανονικότητα των μεταβλητών χρησιμοποιώντας την δοκιμασία κατά Shapiro-Wilk. Ανάλογα με τα αποτελέσματα, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία independent-samples t-test ή η δοκιμασία Mann-Whitney U για να συγκριθούν οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ανοσοανεπαρκών ποντικών (CiNisch και Nisch) και των δύο ομάδων αγρίου τύπου ποντικών (CiBisch και Bisch). Σε όλες τις στατιστικές αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως μικρότερο 0,05 και διπλής κατεύθυνσης. Οι στατιστικές αναλύσεις εφαρμόστηκαν με το στατιστικό πακέτο GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κατάσταση υγείας των ζώων μετά τη χειρουργική επέμβαση

Θα πρέπει να τονιστεί ότι όλοι οι ποντικοί ολοκλήρωσαν τη μελέτη, ενώ κατά τη διάρκειά της δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητα αποτελέσματα, όπως θάνατος ή σοβαρές επιπλοκές του τραύματος. Τις ημέρες D1, D3, D5, και D7 μετά τη χειρουργική επέμβαση, όλα τα ζώα αξιολογήθηκαν μακροσκοπικά. Δεν παρατηρήθηκαν σημεία λοίμωξης σε καμία ομάδα, γεγονός που καταδεικνύει μη σημαντική συστηματική επίδραση της χειρουργικής επέμβασης στην υγεία των ποντικών. Η βαθμολογία σύμφωνα με την χρησιμοποιηθείσα κλίμακα βαθμονόμησης (παράγραφος 2.4) ήταν μηδέν (0) όσον αφορά στη νέκρωση, απεικονίζοντας έτσι την απουσία νέκρωσης για όλες τις πειραματικές ομάδες και μηδέν (0) όσον αφορά στην ισχαιμία, αφού τα ζώα δεν εμφάνισαν νέκρωση των ποδιών ή αποχρωματισμό των δακτύλων (Εικ. 12)



Εικόνα 12. Μακροσκοπική κλινική αξιολόγηση της λειτουργικότητας των πίσω άκρων καθώς και της ύπαρξης νέκρωσης κατά την τρίτη μετεγχειρητική ημέρα (D3).

3.2 Βαθμολόγηση λειτουργικότητας

Σε όλες τις πειραματικές ομάδες, η ενεργός χρήση του δεξιού ποδιού κάθε ποντικού φάνηκε να βελτιώθηκε από την ημέρα D1 έως την D7, όπως αποδείχθηκε από τον σταδιακά μειωμένο χρόνο που απαιτούνταν για να κατέβει από την κορυφή της κατακόρυφης δοκού στο πάτωμα. Επίσης χαρακτηριστική ήταν και η εικόνα των ζώων που συνηγορούσε υπέρ της βελτίωσής τους όπου παρατηρήσαμε διαφοροποίηση του τρόπου καθόδου της δοκού ανάλογα με τη μετεγχειρητική ημέρα (Εικ. 13 a,b,c).

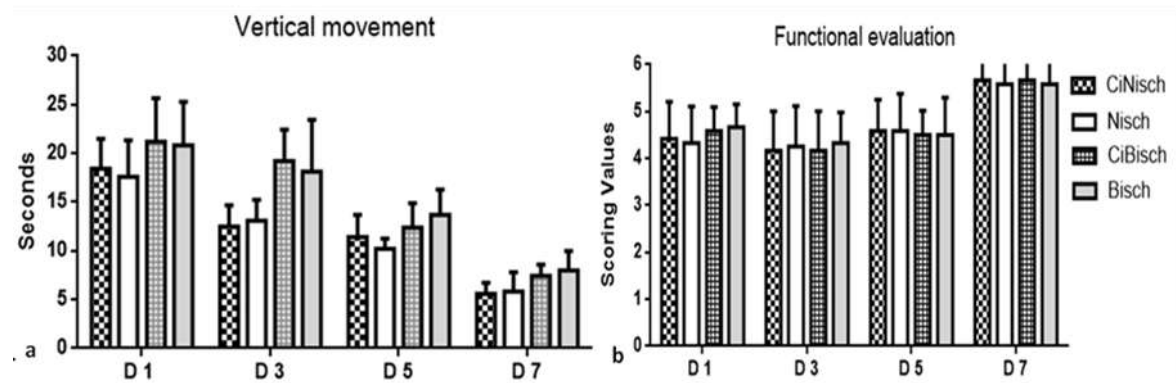


Εικόνα 13a. Χαρακτηριστική εικόνα του τρόπου καθόδου της καθέτου δοκού την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα (D1). **b.** Χαρακτηριστική εικόνα του τρόπου καθόδου της καθέτου δοκού την τρίτη μετεγχειρητική ημέρα (D3). **c.** Χαρακτηριστική εικόνα του τρόπου καθόδου της καθέτου δοκού την εβδομη μετεγχειρητική ημέρα (D7).

Σε αμφότερες τις ομάδες ανοσοανεπαρκών και άγριου τύπου ζώων, η σύγκριση μεταξύ των ζώων που υποβλήθηκαν σε αγωγή με σιλοσταζόλη και των ζώων που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία κατά τη διάρκεια του πειραματικού χρόνου δεν αποκάλυψε στατιστική σημαντικότητα για καμία από τις μετεγχειρητικές ημέρες από την D1 έως την D7 ($p > 0,05$) (Εικ. 14a).

Παρομοίως, τα ποντίκια εμφάνισαν βελτιωμένη λειτουργικότητα με επιταχυνόμενη βελτίωση σύμφωνα με τη βαθμολόγηση κατά Tarlov κατά την περίοδο μετά τη

χειρουργική επέμβαση. Ωστόσο, η προσθήκη σιλοσταζόλης δεν προσέφερε κανένα όφελος (Εικ. 14 a, b).



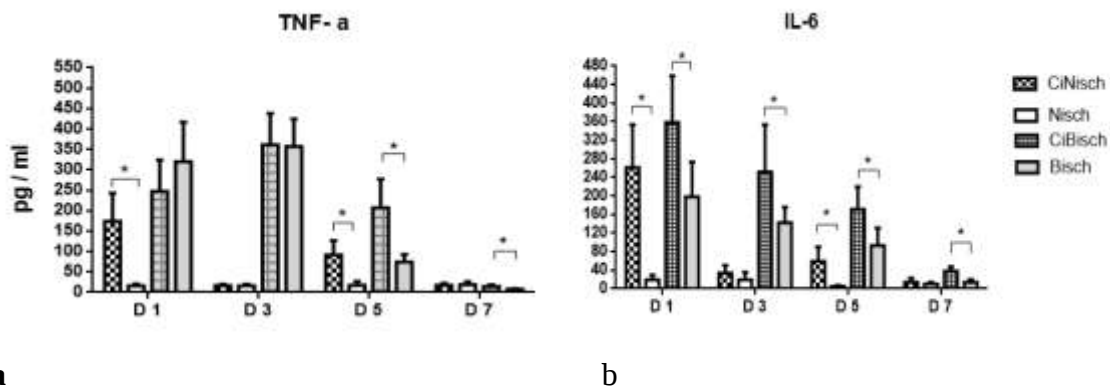
Εικόνα 14a. Αξιολόγηση της λειτουργικότητας του άκρου με τη χρήση της καθέτου δοκού όπου απεικονίζεται ο χρόνος καθόδου του ποντικού. **b.** Μακροσκοπική αξιολόγηση της λειτουργικότητας των πίσω άκρων. Οι αξιολογήσεις έγιναν για τις μετέγχειρητικές ημέρες D1 έως την D7.

3.3. Προφίλ κυτταροκινών

Στη συνέχεια ερευνήσαμε πιθανές επιδράσεις της σιλοσταζόλης στα επίπεδα των TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 και IL-10 στον ορό των NOD-SCID και CB17 ποντικών. Τα επίπεδα της IL-17A παρέμειναν σχεδόν σε μηδενική τιμή σε όλες τις πειραματικές ομάδες καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και δεν αναλύθηκαν περαιτέρω.

Αρχικά, στα ζώα με ανοσοανεπάρκεια, η ανάλυση των κυτταροκινών αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των TNF (Εικ. 15a), IL-6 (Εικ. 15b), και IFN- γ (Εικ. 17a) μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ακολουθώντας ένα παρόμοιο πρότυπο. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των προαναφερθεισών κυτταροκινών αυξήθηκαν απότομα την D1 στην ομάδα CiNisch σε σύγκριση με την ομάδα Nisch ($p < 0,001$) και μειώθηκαν σταδιακά με την πάροδο του χρόνου μέχρι την D7, όταν τα επίπεδα αυτών των τριών κυτταροκινών βρέθηκαν να είναι χαμηλά και στις δύο ομάδες. Οι συγκεντρώσεις των IL-4 (Εικ. 16b), IL-2 (Εικ. 17b) και IL-10 (Εικ. 16a) δεν διέφεραν ($p > 0,05$) μεταξύ των ομάδων κατά τη διάρκεια όλων των ημερών πειραματισμού.

Όσον αφορά τα άγριου τύπου CB17 ζώα, η IL-6 (Εικ. 15b), και η IFN- γ (Εικ. 17a) ήταν σημαντικά αυξημένες στους ποντικούς της ομάδας CiBisch συγκριτικά με την Bisch κατά την περίοδο πειραματισμού ($p < 0,001$). Ο TNF (Εικ. 15a), έδειξε μια καθυστερημένη αύξηση τις ημέρες D5 και D7 στην ομάδα CiBisch ($p < 0,001$). Η IL-4 (Εικ. 16b), βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα των CB17 ποντικών που υποβλήθηκε σε αγωγή με σιλοσταζόλη αλλά μόνο την D1 ($p < 0,001$) μαζί με επίπεδα της IL-10 για την D1 έως την D5 ($p < 0,001$). Αντίθετα, η ομάδα Bisch εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα IL-2 (Εικ. 17b) από την ομάδα CiBisch τις ημέρες D1, D3 και D5.



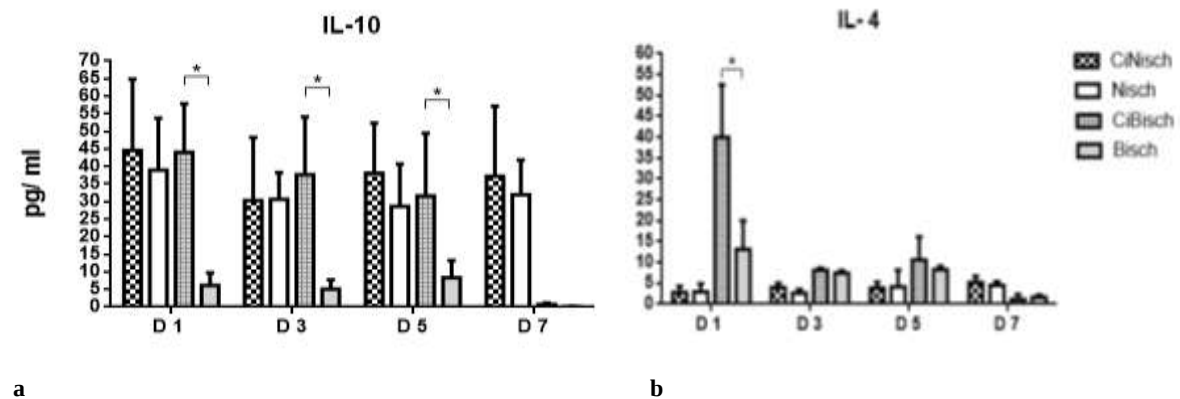
Εικόνα 15 a,b. Τα επίπεδα των TNF- α και IL-6 στο πλάσμα μετρήθηκαν σε όλες τις πειραματικές ομάδες στις μετεγχειρητικές ημέρες 1, 3, 5 και 7.

(a) Για τις συγκεντρώσεις TNF- α , παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch στις D1 και D5 ($p < 0,001$) καθώς επίσης μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch επί των D5 και D7 ($p < 0,001$).

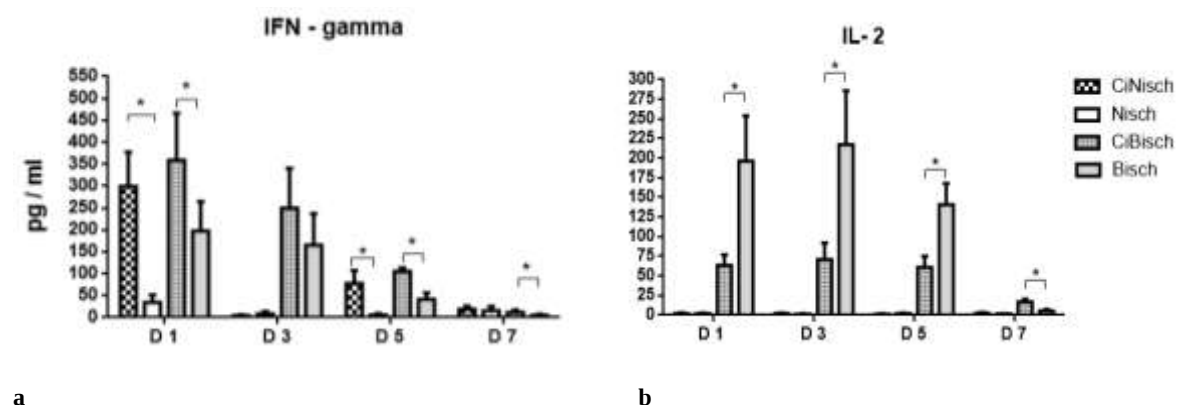
(b) Για τις συγκεντρώσεις IL-6, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch σε D1 και D5 ($p < 0,001$) καθώς και μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch σε όλες τις μετεγχειρητικές ημέρες ($p < 0,001$).

Ο προσδιορισμός των κυτταροκινών στον ορό ποντικού κατά τη διάρκεια της πρώτης μετεγχειρητικής εβδομάδας αποκάλυψε ένα διαφοροποιημένο και χαρακτηριστικό προφίλ ανάμεσα στις ομάδες ελέγχου και χορήγησης σιλοσταζόλης (Πίν. 5, 6, 7, 8). Λόγω του γεγονότος ότι οι κυτταροκίνες αποτελούν μέρος ενός ευρύτερου ανοσολογικού και κυτταρικού δικτύου, το προφίλ που λαμβάνεται είναι καλύτερα κατανοητό αν οι περισσότερες μεταβλητές που συμβάλλουν σε αυτό αναλύονται ταυτόχρονα²²⁰. Αυτή η στρατηγική έχει χρησιμοποιηθεί από τον Williams και συνεργάτες (2013). Έτσι στη μελέτη μας, η χρήση της τεχνολογίας CBA για τη μέτρηση των κυτταροκινών στο ίδιο δείγμα από περιφερικό αίμα είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός προφίλ κυτταροκινών ανά μετεγχειρητική ημέρα που ήταν εύκολο να διακριθεί για τις δύο ομάδες. Η ανάλυση των μεταβολών στο προφίλ

κυτταροκινών Th1 / Th2 στον ορό του αίματος των ισχαιμικών ποντικών κατά την πρώτη εβδομάδα της χειρουργικής επέμβασης παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες, όπου αναγράφεται επίσης το προφίλ των εκκρινόμενων κυτταροκινών και ο τύπος ανοσολογικής απόκρισης όπου αυτό μπορεί να ενταχθεί.



Εικόνα 16 a,b. Τα επίπεδα των IL-10 και IL-4 στο πλάσμα μετρήθηκαν σε όλες τις πειραματικές ομάδες στις μετεγχειρητικές ημέρες 1, 3, 5 και 7.
 (a) Για τις συγκεντρώσεις IL-10, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch σε κάθε θέση ($p > 0.05$) ενώ μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα D1, D3 και D5 ($p < 0.001$). ($p > 0.05$), ενώ μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο D1 ($p < 0.001$), ενώ για τις συγκεντρώσεις
 (d) Για τις συγκεντρώσεις IL-4 δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch σε κάθε μετεγχειρητική ημέρα.



Εικόνα 17 a,b. Τα επίπεδα των IFN-γ και IL-2 στο πλάσμα μετρήθηκαν σε όλες τις πειραματικές ομάδες στις μετεγχειρητικές ημέρες 1, 3, 5 και 7.
 (a) Για τις συγκεντρώσεις IFN-γ, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch στις D1 και D5 ($p < 0.001$) καθώς επίσης μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch επί των D5 και D7 ($p < 0.001$).
 (b) Για τις συγκεντρώσεις IL-2 παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch σε D1 και D5 ($p < 0,001$) καθώς και μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch σε όλες τις μετεγχειρητικές ημέρες ($p < 0,05$).

Πίνακας 5: Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων κυτταροκινών στο ορό των ποντικών (όπως παρουσιάζονται με διαφορετικό χρώμα) αποκαλύπτουν διαφορές συσχετιζόμενες με τον τύπο ανοσολογικής απόκρισης στις πειραματικές ομάδες την μετεγχειρητική ημέρα 1.

Ημέρα 1	IL-2	TNF	IL-6	IL-4	IL-10	IFN-γ	Τύπος απόκρισης
Bisch	High	High	Medium	Low	Low	Medium	φλεγμονώδης Th1 τύπος
CiBisch	Medium	High	High	Medium	High	High	Ενίσχυση τύπου Th2 και ρυθμιστικού Th1 τύπου
Nisch	Very Low	Low	Low	Low	High	Very Low	Η IL-10 προάγει τον ρυθμιστικό T τύπο
CiNisch	Very Low	Medium	Medium	Low	High	High	Η IL-10 προάγει τον ρυθμιστικό T τύπο. Οι TNF και IL-6 ενεργοποιούν τον Th1 τύπο.

Πίνακας 6: Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων κυτταροκινών στο ορό των ποντικών (όπως παρουσιάζονται με διαφορετικό χρώμα) αποκαλύπτουν διαφορές συσχετιζόμενες με τον τύπο ανοσολογικής απόκρισης στις πειραματικές ομάδες την μετεγχειρητική ημέρα 3.

Ημέρα 3	IL-2	TNF	IL-6	IL-4	IL-10	IFN-γ	Τύπος απόκρισης
Bisch	High	High	Medium	Low	Low	Medium	φλεγμονώδης Th1 τύπος
CiBisch	Medium	High	Medium	Low	High	High	Ενίσχυση τύπου Th2 και ρυθμιστικού Th1 τύπου
Nisch	Very Low	Low	Low	Low	High	Very Low	Η IL-10 προάγει τον ρυθμιστικό T τύπο
CiNisch	Very Low	Low	Medium	Low	High	Very Low	Η IL-10 προάγει τον ρυθμιστικό T τύπο

Πίνακας 7: Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων κυτταροκινών στο ορό των ποντικών (όπως παρουσιάζονται με διαφορετικό χρώμα) αποκαλύπτουν διαφορές συσχετιζόμενες με τον τύπο ανοσολογικής απόκρισης στις πειραματικές ομάδες την μετεγχειρητική ημέρα 5.

Ημέρα 5	IL-2	TNF	IL-6	IL-4	IL-10	IFN-γ	Τύπος απόκρισης
Bisch	High	Medium	Medium	Low	Low	Low	φλεγμονώδης Th1 τύπος
CiBisch	Medium	Medium	Medium	Low	High	Medium	Ενίσχυση τύπου Th2
Nisch	Very Low	Low	Very Low	Low	High	Very Low	Η IL-10 προάγει τον ρυθμιστικό T τύπο
CiNisch	Very Low	Medium	Medium	Low	High	Medium	Η IL-10 προάγει τον ρυθμιστικό T τύπο

Πίνακας 8: Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων κυτταροκινών στο ορό των ποντικών (όπως παρουσιάζονται με διαφορετικό χρώμα) αποκαλύπτουν διαφορές συσχετιζόμενες με τον τύπο ανοσολογικής απόκρισης στις πειραματικές ομάδες την μετεγχειρητική ημέρα 7.

Ημέρα 7	IL-2	TNF	IL-6	IL-4	IL-10	IFN-γ	Τύπος απόκρισης
Bisch	Very Low	Very Low	Very Low	Very Low	Very Low	Very Low	Λύση της φλεγμονής
CiBisch	Low	Low	Very Low	Very Low	Very Low	Low	Λύση της φλεγμονής
Nisch	Very Low	Low	Very Low	Low	High	Low	Η IL-10 προάγει τον ρυθμιστικό T τύπο
CiNisch	Very Low	Low	Low	Low	High	Low	Η IL-10 προάγει τον ρυθμιστικό T τύπο

3.4. Βιοκατανομή του ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK

Τα αποτελέσματα της ex vivo βιοκατανομής του ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Ex vivo βιοκατανομή του ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK με τη χρήση του Gamma Well Counting of tissue activity.

	CiNisch	Nisch	CiBisch	Bisch
Ιστός	Mean $\pm$ SD (% ID/g)	Mean $\pm$ SD (% ID/g)	Mean $\pm$ SD (% ID/g)	Mean $\pm$ SD (% ID/g)
Αίμα	1.82 $\pm$ 1.01	1.97 $\pm$ 0.36	1.59 $\pm$ 0.46	1.94 $\pm$ 0.85
Καρδιά	1.08 $\pm$ 0.44	1.04 $\pm$ 0.15	1.04 $\pm$ 0.24	1.21 $\pm$ 0.51
Ήπαρ	1.23 $\pm$ 0.46	1.15 $\pm$ 0.34	1.37 $\pm$ 0.37	1.43 $\pm$ 0.49
Σπλήνας	1.37 $\pm$ 0.57	1.12 $\pm$ 0.23	3.80 $\pm$ 1.26	1.75 $\pm$ 0.67
Πνεύμονας	2.25 $\pm$ 0.90	1.60 $\pm$ 0.66	2.37 $\pm$ 0.65	2.08 $\pm$ 1.25
Νεφροί	6.19 $\pm$ 2.21	5.17 $\pm$ 0.69	4.81 $\pm$ 0.84	5.31 $\pm$ 1.13
Στομάχι	1.33 $\pm$ 0.44	1.07 $\pm$ 0.55	1.84 $\pm$ 0.46	1.59 $\pm$ 0.46
Έντερο	1.10 $\pm$ 0.76	0.83 $\pm$ 0.24	1.11 $\pm$ 0.30	0.95 $\pm$ 0.76
Αριστερό άκρο	1.43 $\pm$ 0.66	3.42 $\pm$ 1.24	2.51 $\pm$ 0.92	1.58 $\pm$ 0.65
Δεξί άκρο	1.90 $\pm$ 0.85	3.82 $\pm$ 1.35	2.71 $\pm$ 1.47	2.15 $\pm$ 0.89

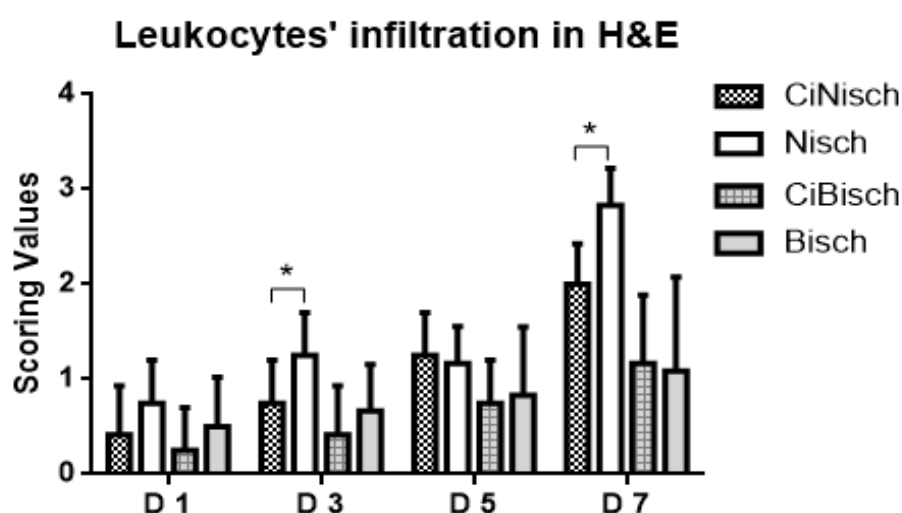
Παρατηρούμε ότι η ομάδα Nisch εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη πρόσληψη ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK και για τα δύο πόδια από τα αντίστοιχα άκρα στα ζώα που είχαν λάβει σιλοσταζόλη (αριστερό οπίσθιο άκρο $p < 0,001$ και δεξί οπίσθιο άκρο $p < 0,001$). Οι τιμές πρόσληψης για όλους τους άλλους ιστούς (καρδιά, ήπαρ, σπλήνας, πνεύμονας, στομάχος και έντερο) ήταν ελαφρώς υψηλότερες στους CiNisch ποντικούς με εξαίρεση τους νεφρούς όπου οι διαφορές στις μέσες τιμές πρόσληψης παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα ($p < 0,05$).

Αντίθετα με τους ανοσοανεπαρκείς μύες, η πρόσληψη του ^{68}Ga -NODAGA-RGDfK ήταν υψηλότερη στα ζώα άγριου τύπου που έλαβαν θεραπεία με σιλοσταζόλη από ότι στα ζώα ελέγχου και για τα δύο άκρα (αριστερό οπίσθιο άκρο $p = 0,048$ και δεξί

οπίσθιο άκρο $p > 0,05$). Εκτός αυτού, η πρόσληψη του πεπτιδίου στον σπλήνα αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα CiBisch σε σχέση με την ομάδα Bisch ($p < 0,001$). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για τους υπόλοιπους ιστούς που αξιολογήθηκαν μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch ($p > 0,05$).

3.5 Ιστολογική αξιολόγηση

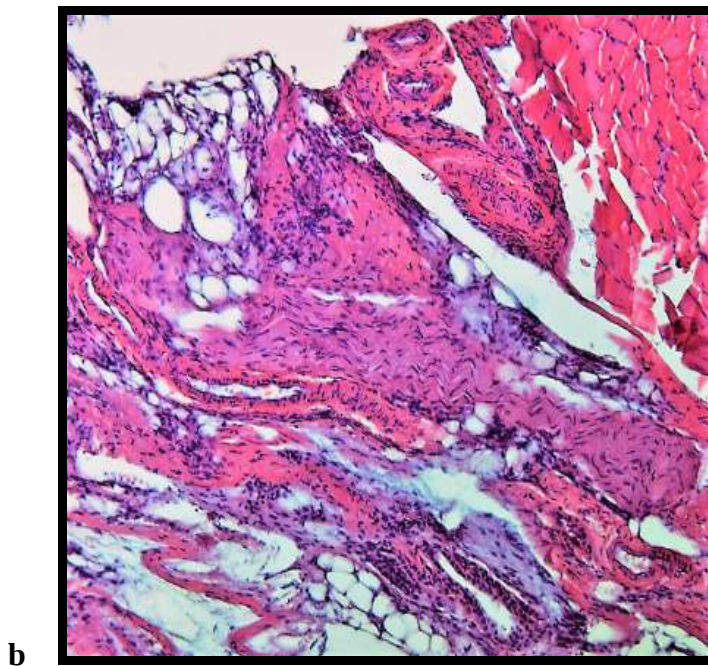
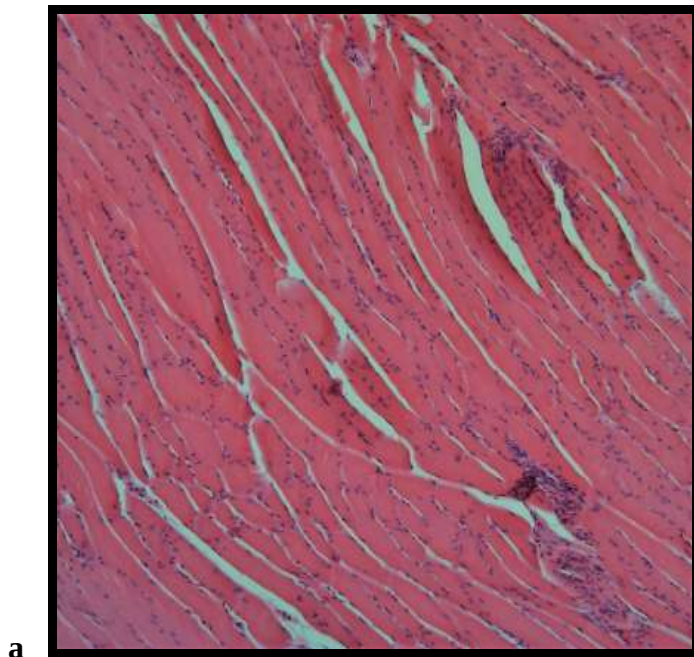
Αναφορικά με τα αποτελέσματα της χρώσης αιματοξυλίνης/ηωσίνης μετρήθηκε το ποσοστό θετικής χρώσης σε 20 πεδία ανά ιστολογικό δείγμα. Η χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης του γαστροκνημίου μυ σε ζώα με ανοσοανεπάρκεια κατέδειξε σημαντική αύξηση της διήθησης των λευκοκυττάρων στην ομάδα Nisch τις ημέρες D3 και D7 σε σύγκριση με την ομάδα CiNisch (Εικ. 17).



Εικόνα 17. Η διήθηση των λευκοκυττάρων μετρήθηκε σε όλες τις πειραματικές ομάδες στις μετεγχειρητικές ημέρες D1, D3, D5 και D7. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch στις D3 και D7 ($p < 0,05$) ενώ σε καμία μετεγχειρητική ημέρα δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch ($p > 0,05$).

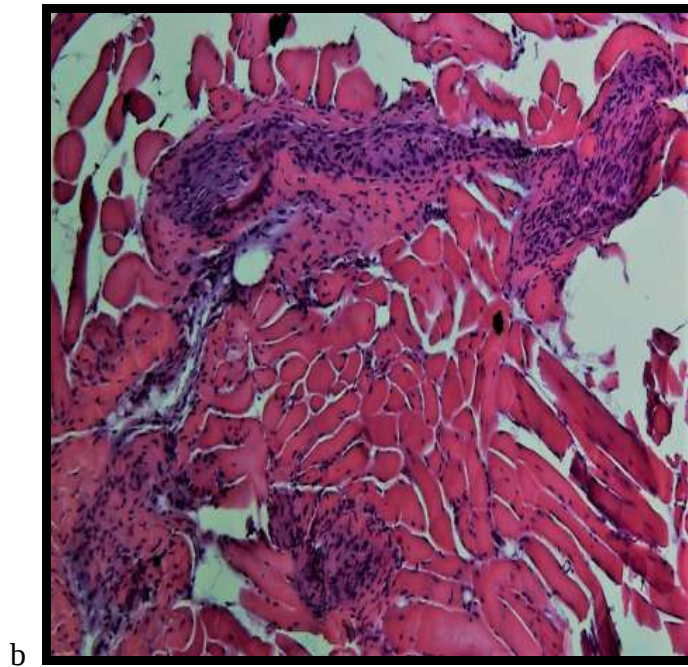
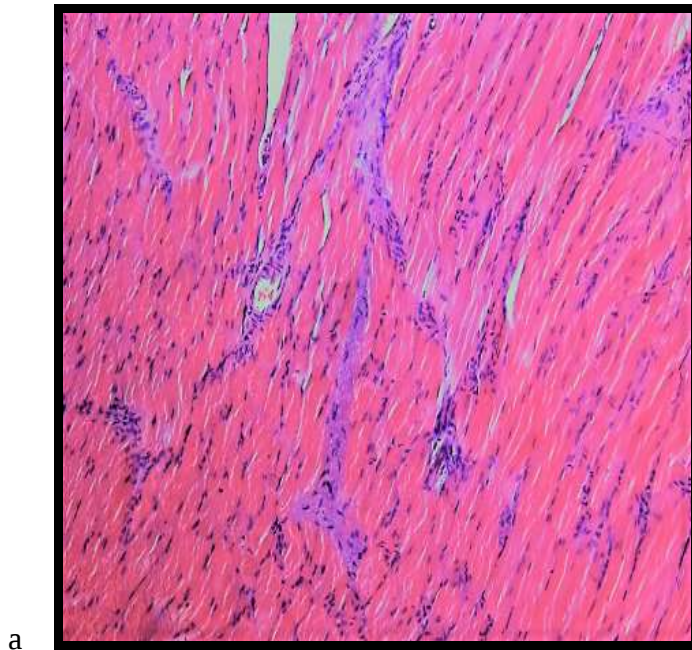
Ειδικότερα η διήθηση των λευκοκυττάρων στα ανοσοανεπαρκή ζώα ανεξαρτήτως της χορήγησης σιλοσταζόλης φαίνεται να έχει μία αύξουσα εξέλιξη στο χρόνο. Τα ιστολογικά παρασκευάσματα δεν έχουν εικόνα φλεγμονώδους διήθησης την πρώτη (D1) μετεγχειρητική ημέρα. Αντίθετα, ιδιαίτερα σημαντικές φαίνονται να είναι οι D3 και D7 όπου και παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των διηθούντων λευκοκυττάρων ανάμεσα στις ομάδες CiNisch και Nisch. Τέλος, την D7 ο γαστροκνήμιος μυς των ανοσοανεπαρκών ποντικών φαίνεται να φλεγμαίνει περισσότερο από τις προηγούμενες ημέρες.

Αναφορικά με τα αποτελέσματα της χρώσης αιματοξυλίνης/ηωσίνης μετρήθηκε διήθηση των λευκοκυττάρων σε 20 πεδία ανά ιστολογικό δείγμα. Στα ανοσοανεπαρκή ζώα δεν φάνηκε περιορισμός της φλεγμονής μετά την επίδραση της σιλοσταζόλης από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p > 0,05$) την πρώτη (D1) μετεγχειρητική ημέρα. Αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a) και Nisch (e) παρουσιάζονται στην Εικόνα 18.



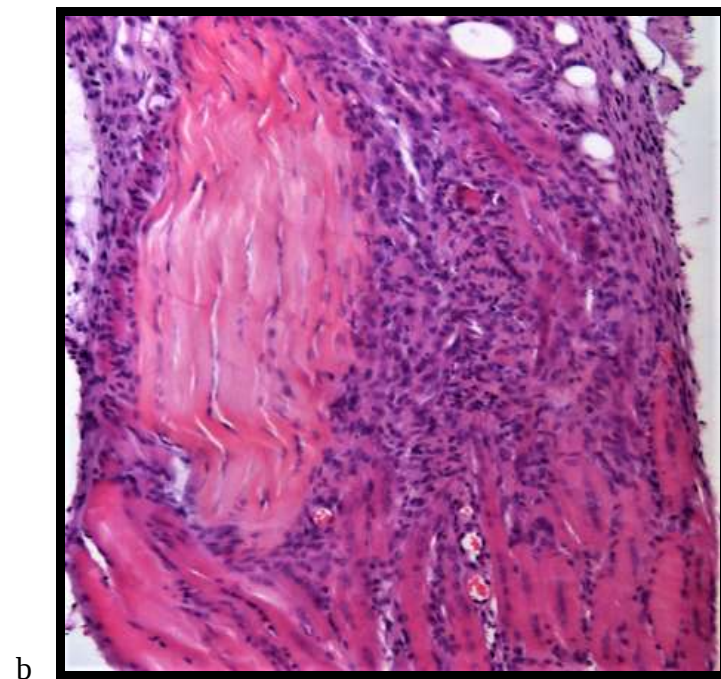
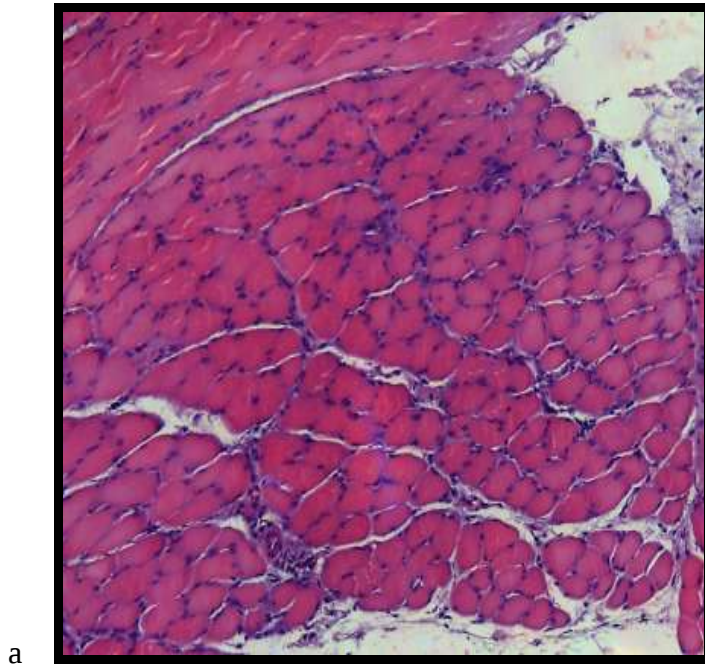
Εικόνα 18. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ιστολογικής ανάλυσης του δεξιού γαστροκνημίου μυός για CiNisch (a) και Nisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D1 (H & E χρώση, μεγέθυνση x20).

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των λευκοκυττάρων στα ανοσοανεπαρκή ζώα κατά την τρίτη μετεγχειρητική ημέρα (D3) όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p < 0,05$). Η σιλοσταζόλη φαίνεται να ασκεί σημαντική δράση στον περιορισμό της φλεγμονής όπως φαίνεται και από τις αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a) και Nisch (b)(Εικ. 19).



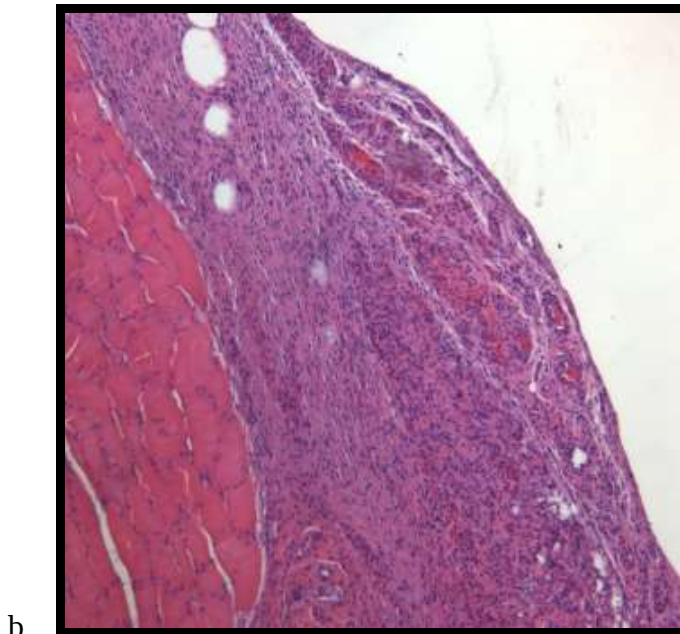
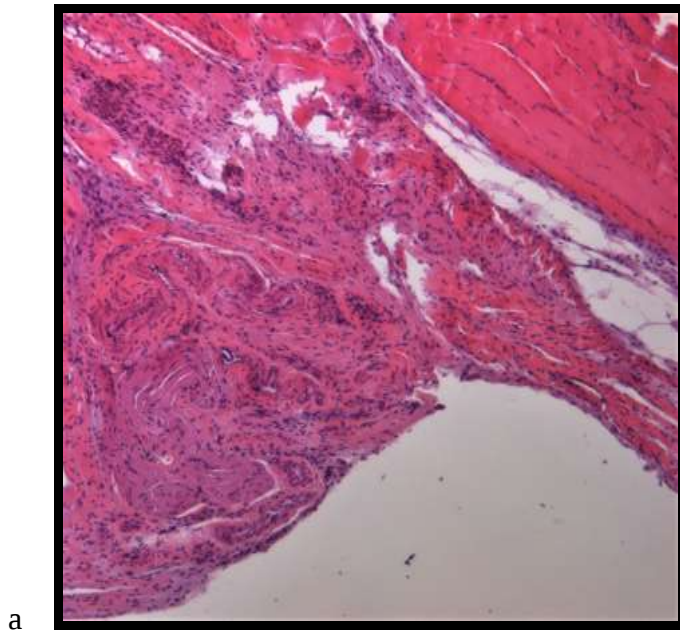
Εικόνα 19. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ιστολογικής ανάλυσης του δεξιού γαστροκνημίου μυός για CiNisch (a) και Nisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D3. (H & E χρώση, μεγέθυνση x20).

Δεν φαίνεται επίσης να υπάρχει επίδραση της σιλοσταζόλης στον περιορισμό της φλεγμονής στα ανοσοανεπαρκή ζώα όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p > 0,05$) κατά την πέμπτη (D5) μετεγχειρητική ημέρα. Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a) και Nisch (b) (Εικ. 20).



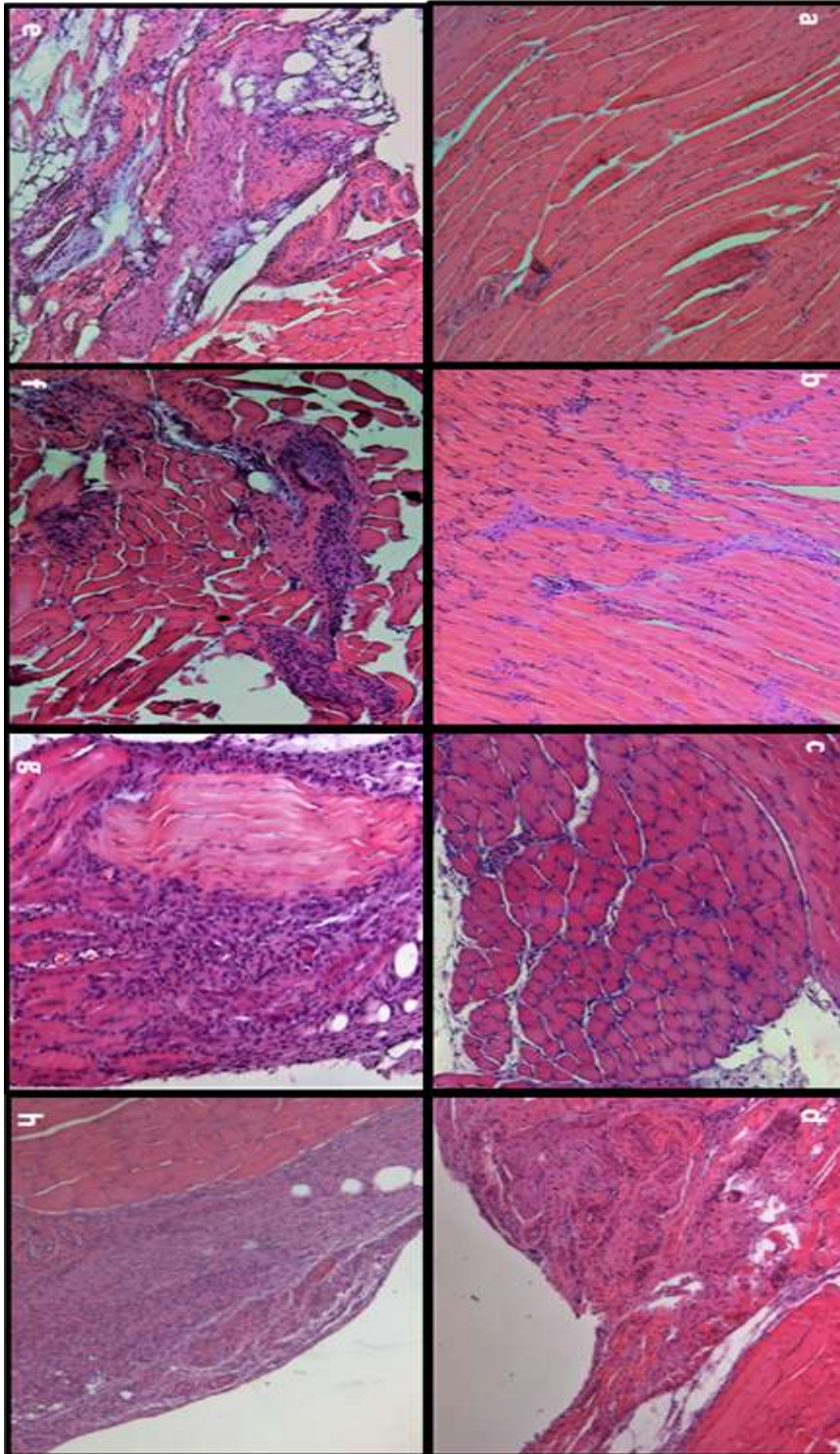
Εικόνα 20. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ιστολογικής ανάλυσης του δεξιού γαστροκνημίου μυός για CiNisch (a) και Nisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D5. (H & E χρώση, μεγέθυνση x20).

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των λευκοκυττάρων στα ανοσοανεπαρκή ζώα κατά την έβδομη (D7) μετεγχειρητική ημέρα όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p < 0,05$). Η σιλοσταζόλη φαίνεται να ασκεί σημαντική δράση στον περιορισμό της φλεγμονής όπως φαίνεται και από τις αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a) και Nisch (b) (Εικ. 21).



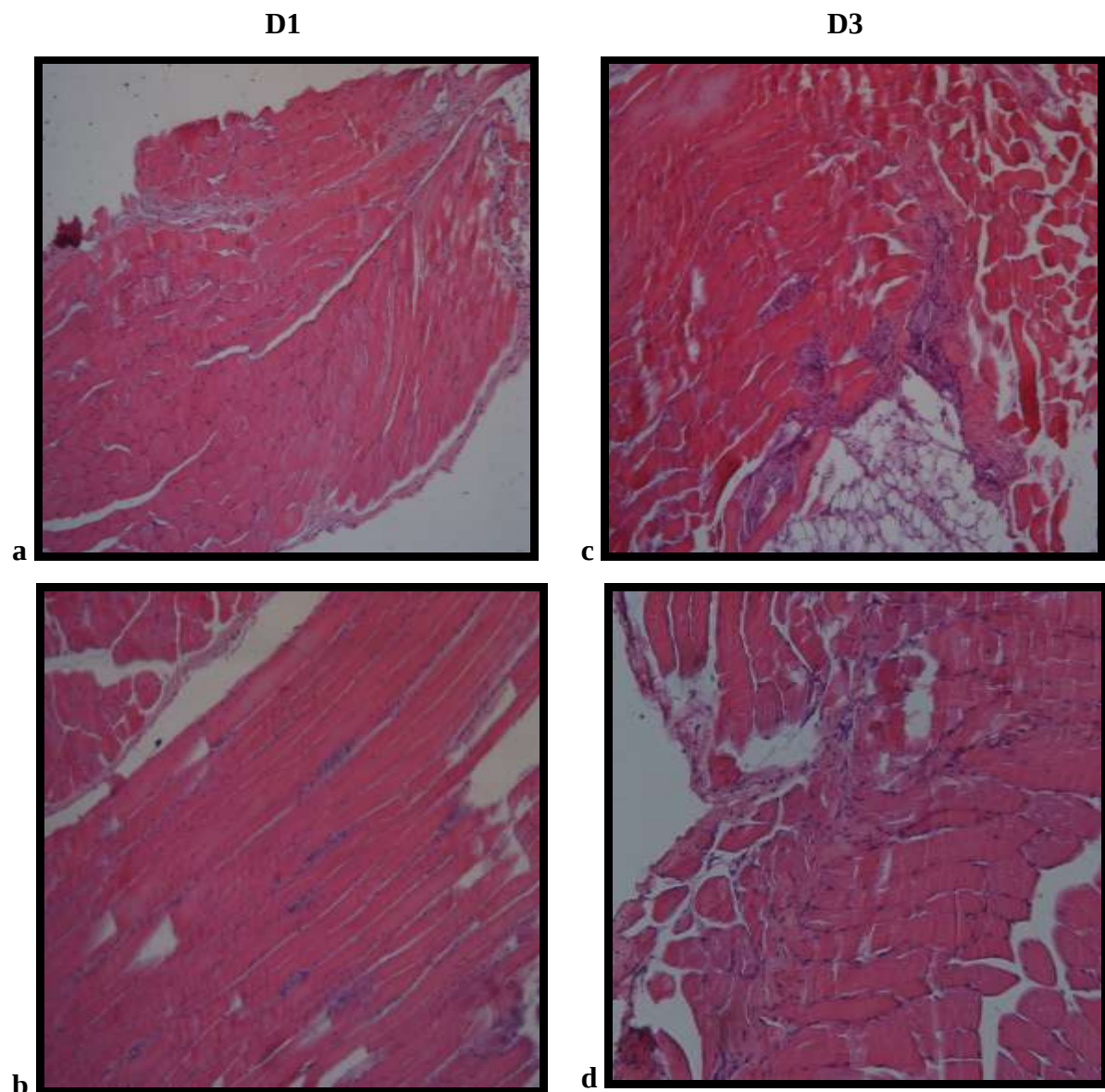
Εικόνα 21. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ιστολογικής ανάλυσης του δεξιού γαστροκνημίου μυός για CiNisch (a) και Nisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D7 (H & E χρώση, μεγέθυνση x20).

Παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στην Εικ. 22 οι αντιπροσωπευτικότερες φωτογραφίες από τις ομάδες CiNisch και Nisch όπου απεικονίζεται η εξέλιξη της φλεγμονώδους διήθησης στο δεξί γαστροκνήμιο μυ.



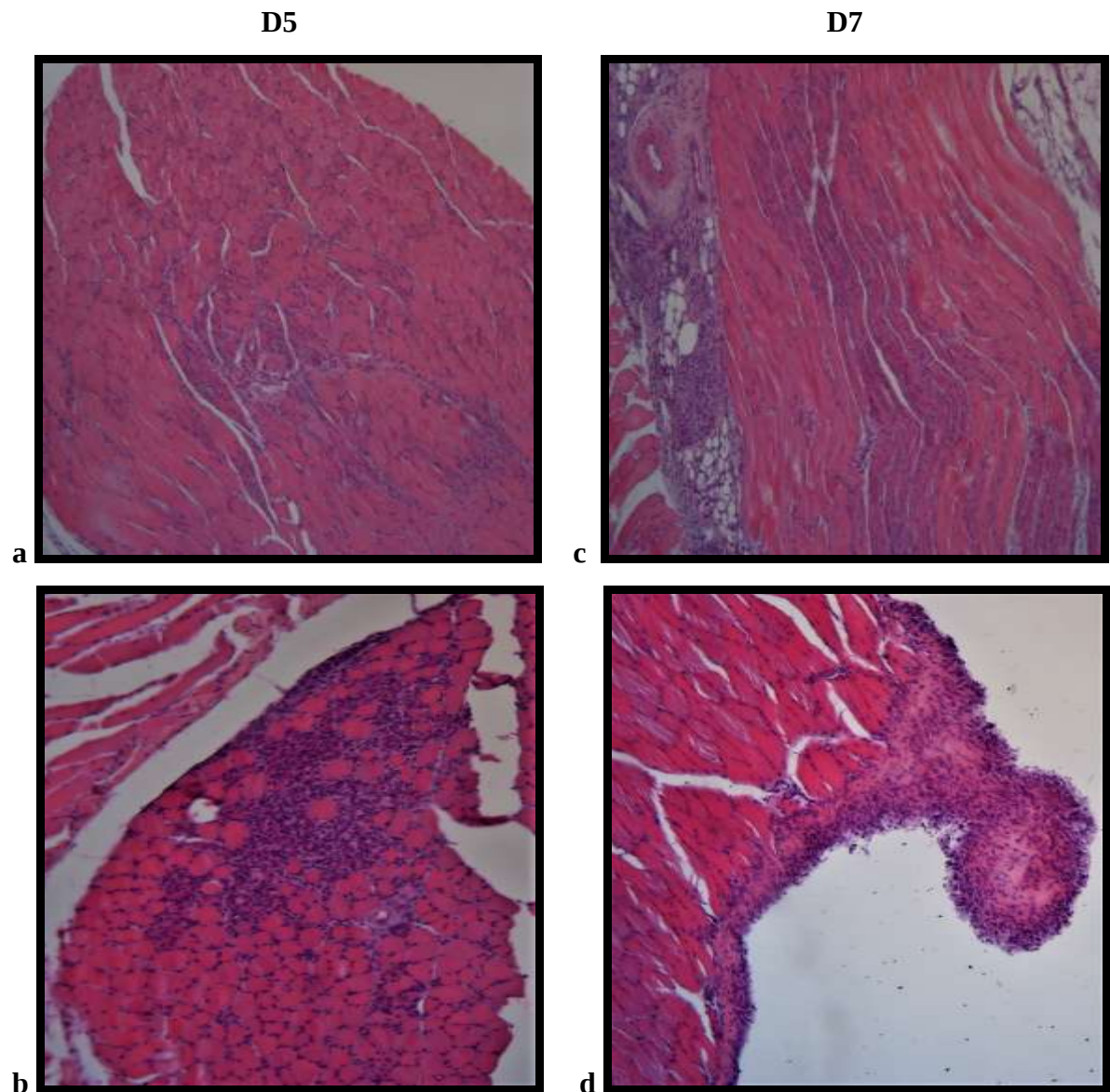
Εικόνα 22 a, h. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ιστολογικής ανάλυσης του δεξιού γαστροκνήμιου μύος για CiNisch (ομάδες a-d) και Nisch (ομάδες e-h). Η διήθηση λευκοκυττάρων αξιολογήθηκε σε κάθε μετεγχειρητική ημέρα (D1: a & e · D3: b & f · D5: c & g · D7: d & h). Η & Ε χρώση; x20

Αναφορικά με τα αποτελέσματα της χρώσης αιματοξυλίνης/ηωσίνης στα αγρίου τύπου ζώα, μετρήθηκε επίσης η διήθηση των λευκοκυττάρων σε 20 πεδία ανά ιστολογικό δείγμα. Και σε αυτά τα ζώα, η διήθηση των λευκοκυττάρων ανεξαρτήτως της χορήγησης σιλοσταζόλης φαίνεται να έχει μία αύξουσα εξέλιξη στο χρόνο. Από τις τομές προκύπτει ότι η φλεγμονώδης διήθηση ήταν χαμηλή στις μετεγχειρητικές μέρες D1 (Εικ. 23 a, c) και D3 (Εικ. 23 b, d) χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες Bisch και CiBisch. Οι φλεγμονώδεις περιοχές δεν ήταν εκτεταμένες για τις προαναφερθείσες ημέρες.



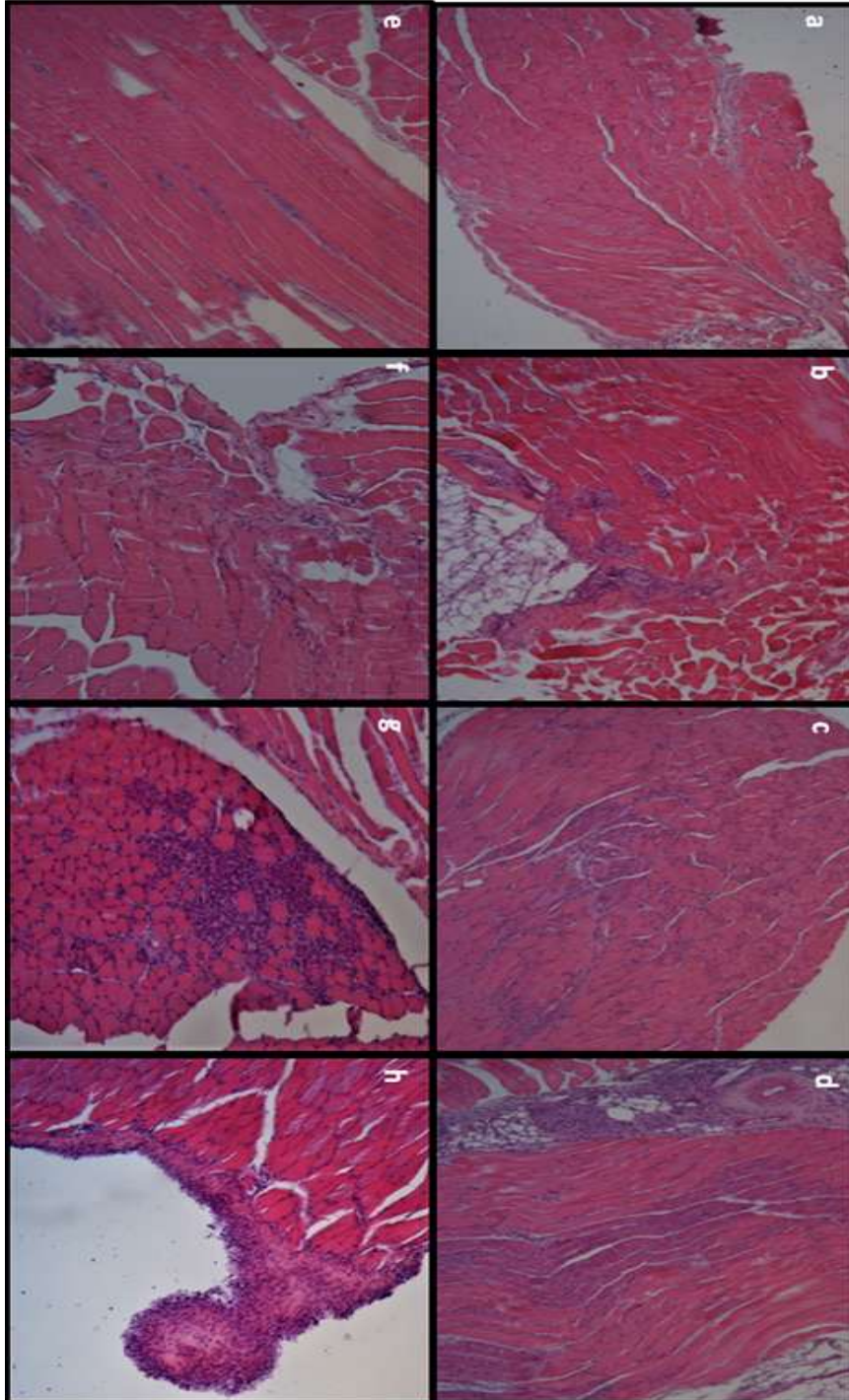
Εικόνα 23. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ιστολογικής ανάλυσης του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiBisch (a, c) και Bisch (b, d) για τις μετεγχειρητικές ημέρες D1 και D3 (H & E χρώση, μεγέθυνση x20).

Στις μετεγχειρητικές μέρες D5, D7 η διήθηση των λευκοκυττάρων ήταν υψηλότερη χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες Bisch και CiBisch. Οι φλεγμονώδεις περιοχές φαίνονται πιο εκτεταμένες για τις προαναφερθείσες ημέρες (Εικ. 24 c, d, g, h). Στην περίπτωση των ζώων αγρίου τύπου όπως και στα ανοσοανεπαρκή, ο γαστροκνήμιος μυς φαίνεται να φλεγμαίνει περισσότερο την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα (D7) από ότι τις προηγούμενες ημέρες.



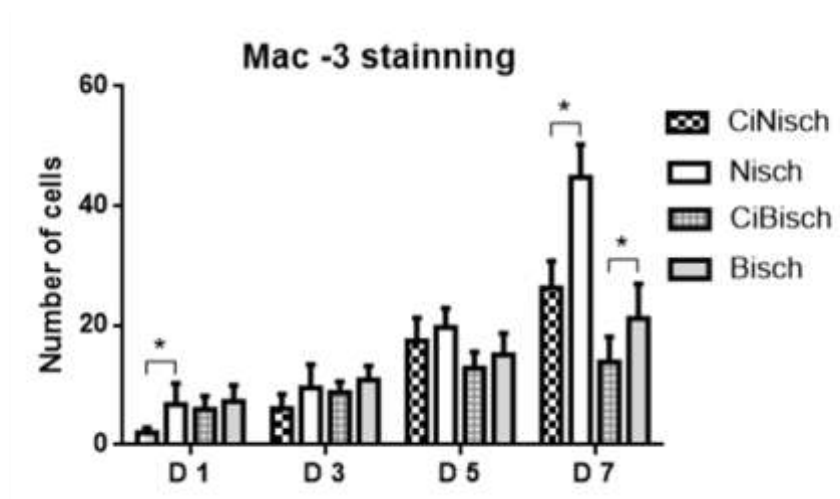
Εικόνα 24. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ιστολογικής ανάλυσης του δεξιού γαστροκνημίου μύος για τις ομάδες CiBisch (a, c) και Bisch (b, d) για τις μετεγχειρητικές ημέρες D1 και D3 (H & E χρώση, μεγέθυνση x20).

Προς σύγκριση, παρουσιάζεται συγκεντρωτικό πάνελ εικόνων για τις ομάδες CiBisch και Bisch όπου απεικονίζεται η εξέλιξη της φλεγμονώδους διήθησης στο δεξί γαστροκνήμιο μυ.



Εικόνα 25 a, h. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ιστολογικής ανάλυσης του δεξιού γαστροκνήμιου μύος για CiBisch (ομάδες a-d) και Bisch (ομάδες e-h). Η διήθηση λευκοκυττάρων αξιολογήθηκε σε κάθε μετεγχειρητική ημέρα (D1: a & e · D3: b & f · D5: c & g · D7: d & h). Η & Ε χρώση; x20

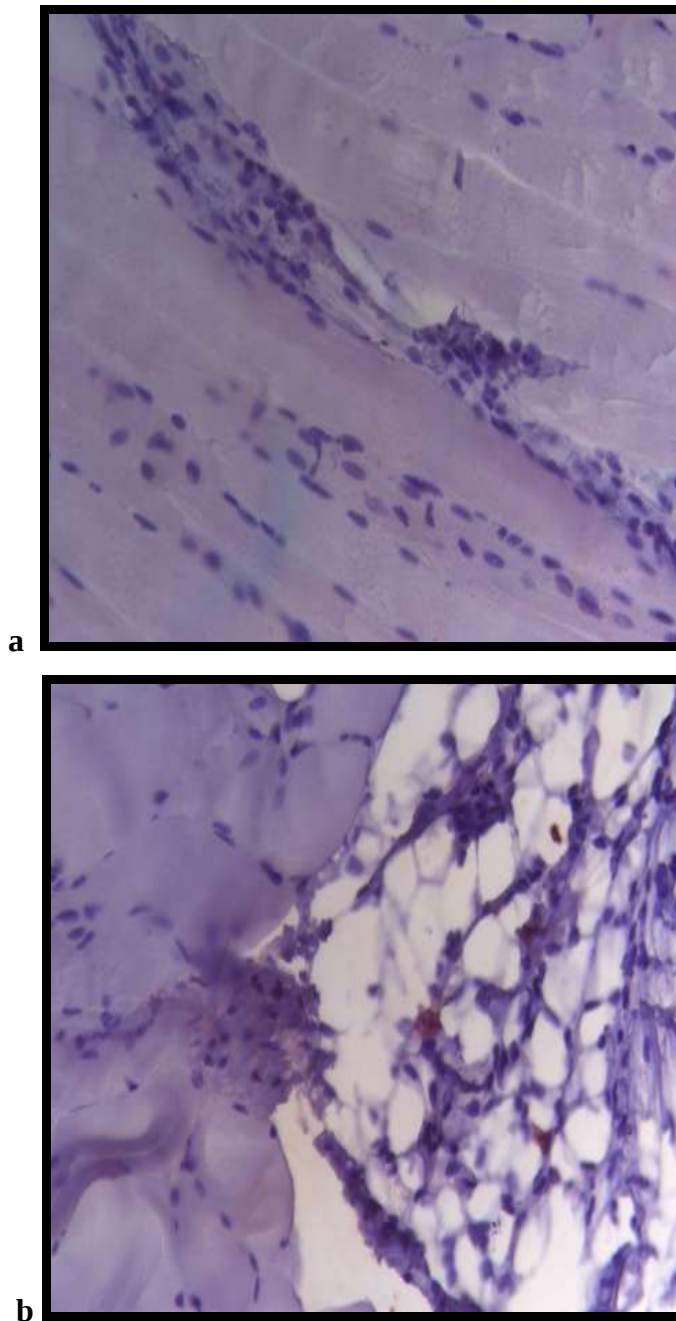
Αναφορικά με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με τη χρήση του anti-Mac-3 αντισώματος μετρήθηκε το ποσοστό θετικής χρώσης σε 20 πεδία ανά ιστολογικό δείγμα. Με καφέ χρώμα εμφανίζονται τα εντοπισθέντα μακροφάγα. Το ποσοστό θετικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος κατέδειξε σημαντικά στατιστική αύξηση στα ανοσοανεπαρκή ζώα της ομάδας Nisch έναντι της ομάδας CiNisch κατά την πρώτη (D1) ($p < 0,05$) και έβδομη (D7) μετεγχειρητικές ημέρες ($p < 0,01$) (Εικ. 19).



Εικόνα 26. Οι αριθμοί μακροφάγων μετρήθηκαν σε όλες τις πειραματικές ομάδες τις μετεγχειρητικές ημέρες D1, D3, D5 και D7. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch στα D1 και D7 ($p < 0,05$) ενώ μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch στατιστικά σημαντική διαφορά στο D7 ($p < 0,05$).

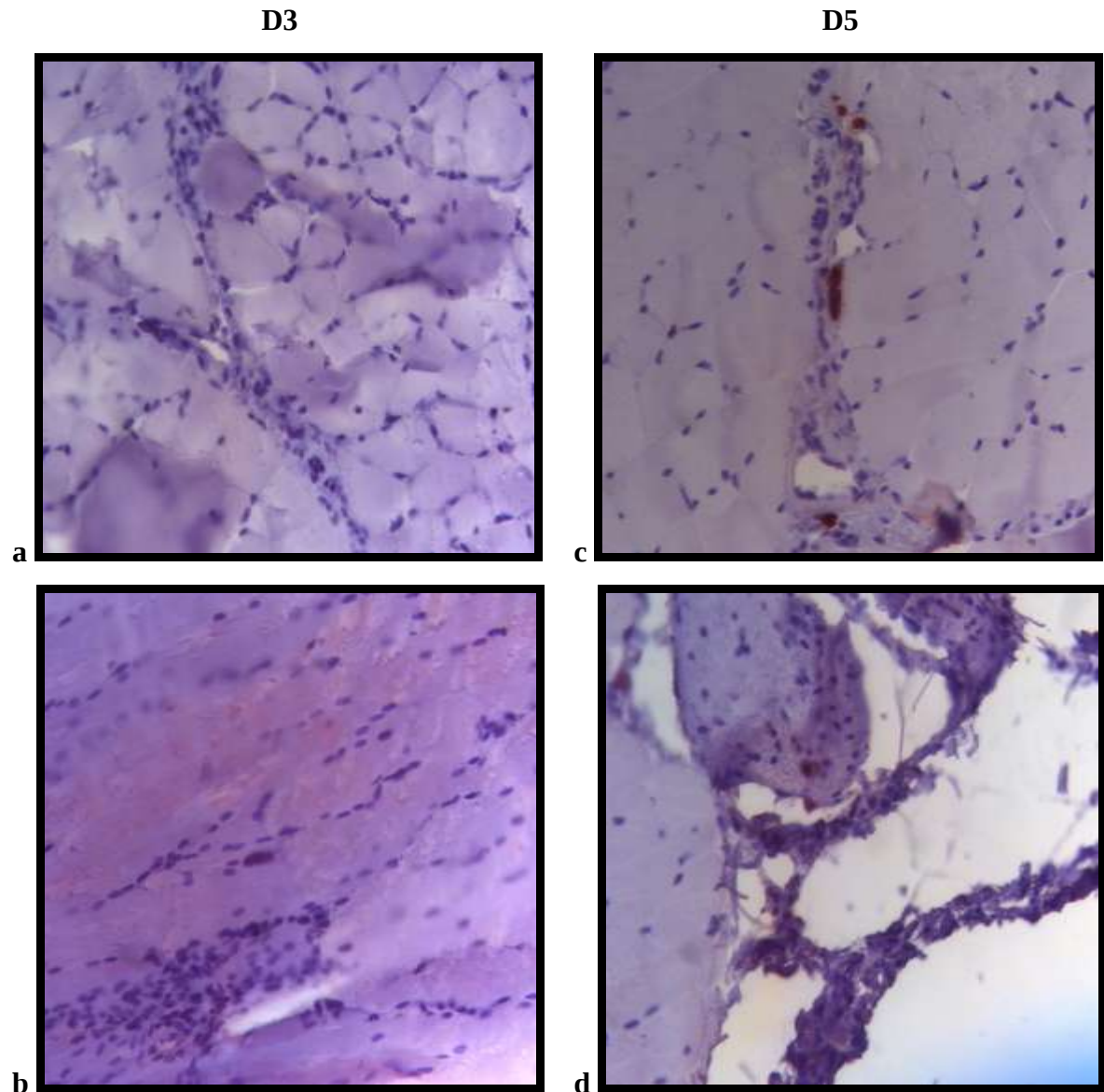
Ειδικότερα η διήθηση των μακροφάγων στα ανοσοανεπαρκή ζώα φαίνεται να έχει μία αύξουσα εξέλιξη στο χρόνο. Ιδιαίτερα σημαντικές φαίνονται να είναι οι D1 και D7 όπου και παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των παρατηρηθέντων μακροφάγων. Τις D1 και D3 δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση των παρατηρηθέντων μακροφάγων, εικόνα που αλλάζει κατά την D5 και διαφοροποιείται πλήρως την μετεγχειρητική ημέρα D7. Την D7 ο γαστροκνήμιος μυς φαίνεται να φλεγμαίνει περισσότερο από τις προηγούμενες ημέρες.

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των μακροφάγων στα ανοσοανεπαρκή ζώα κατά την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα D1 όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p < 0,05$). Στην Εικόνα 27 παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a) και Nisch (b).



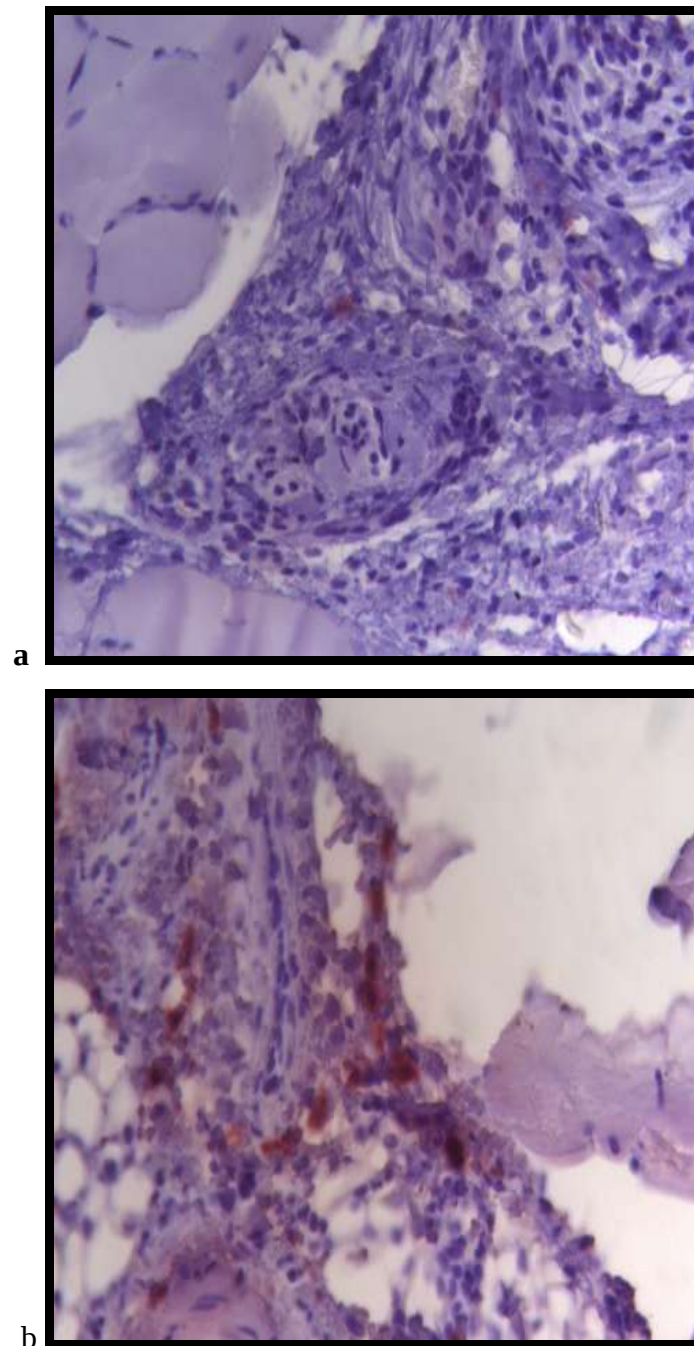
Εικόνα 27 (a, b). Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiNisch (a) και Nisch (e) για τη μετεγχειρητική ημέρα D1 (μεγέθυνση X40).

Δεν φαίνεται επίσης να υπάρχει επίδραση της σίλοσταζόλης στον περιορισμό του αριθμού των ανιχνευθέντων μακροφάγων στα ανοσοανεπαρκή ζώα όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p > 0,05$) κατά την τρίτη (D3) και πέμπτη (D5) μετεγχειρητικές ημέρες. Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a, c) και Nisch (d, d) (Εικ. 28).



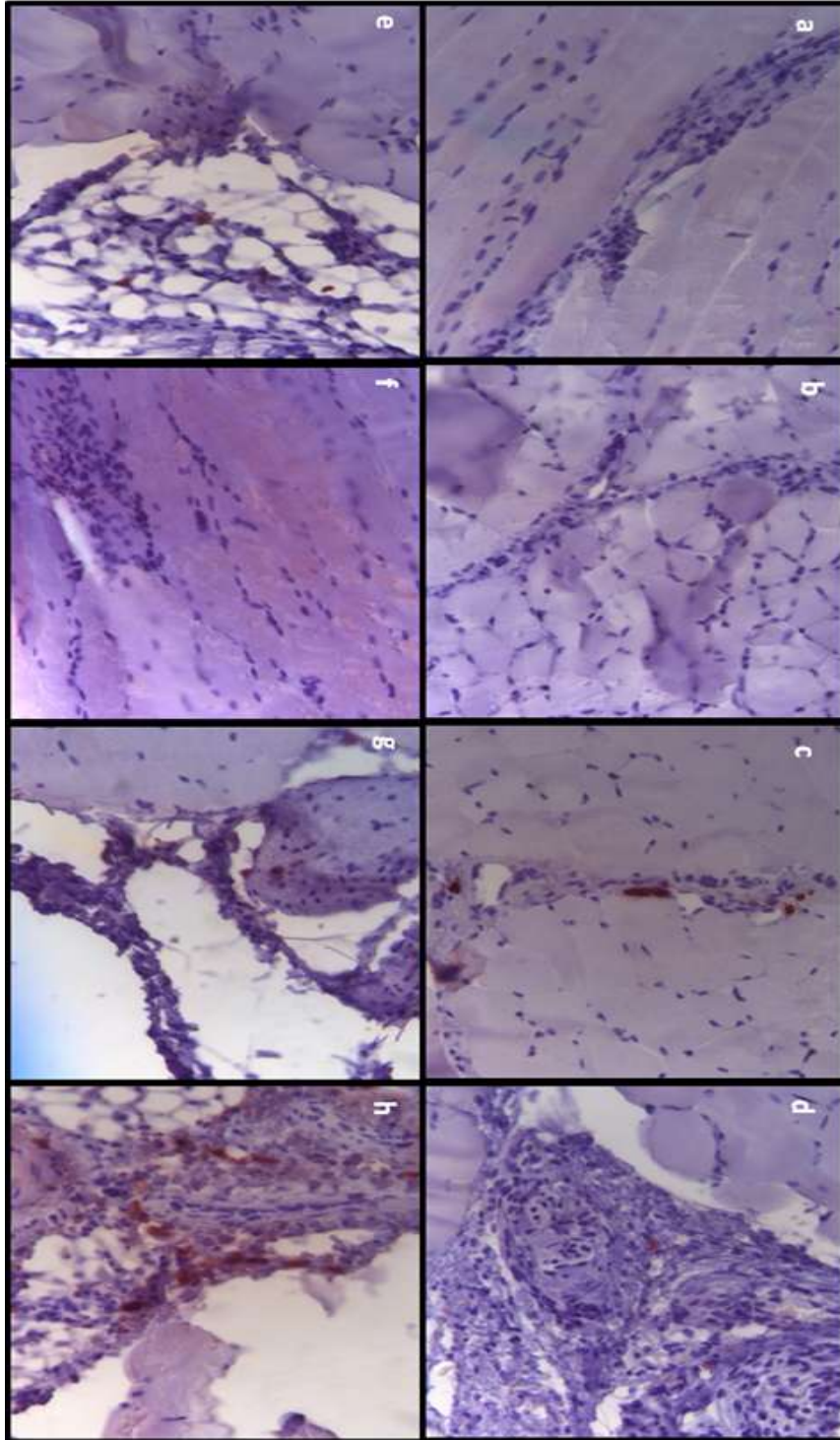
Εικόνα 28 (a,b,c,d). Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiNisch (b, c) και Nisch (f, g) για τις μετεγχειρητικές ημέρες D3 και D5 (μεγάθυνη X40).

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των μακροφάγων στα ανοσοανεπαρκή ζώα κατά την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα (D7) όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p < 0,05$). Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a) και Nisch (b) (Εικ. 29).



Εικόνα 29 (a, b). Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiNisch (a) και Nisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D7 (μεγέθυνση X40).

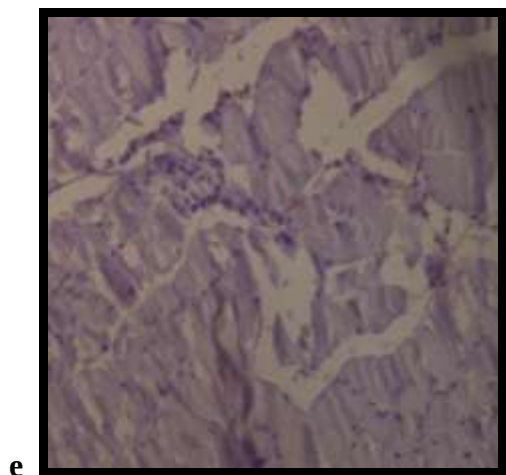
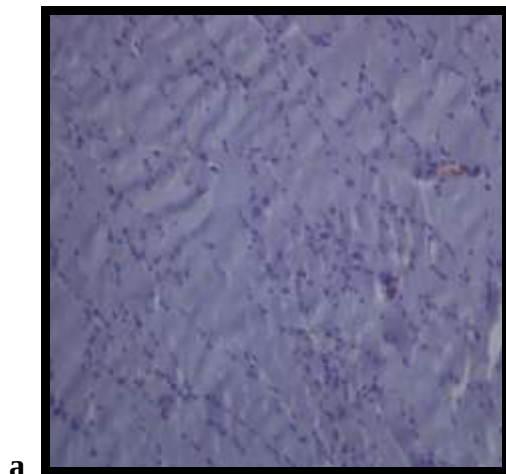
Προς σύγκριση, παρουσιάζεται συγκεντρωτικό πάνελ εικόνων για τις ομάδες CiNisch και Nisch όπου απεικονίζεται η διήθηση των μικροφάγων που ανιχνεύθηκαν έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος στο δεξί γαστροκνήμιο μυ (Εικ. 30).



Εικόνα 30 a, h. Ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα έναντι μακροφάγων (Mac-3) για CiNisch (ομάδες a-d) και Nisch (ομάδες e-h). Οι τομές αντισταθμίστηκαν με H & E (20x). Οι αριθμοί μακροφάγων αξιολογήθηκαν σε κάθε μετεγχειρητική ημέρα (D1: a & e · D3: b & f · D5: c & g · D7: d & h).

Αναφορικά με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος, μετρήθηκε το ποσοστό θετικής χρώσης σε 20 πεδία ανά ιστολογικό δείγμα στα αγρίου τύπου ζώα. Το ποσοστό θετικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος κατέδειξε σημαντικά στατιστική αύξηση στα αγρίου τύπου ζώα της ομάδας Bisch έναντι της ομάδας CiBisch μόνο κατά την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα (D7) ($p < 0,01$).

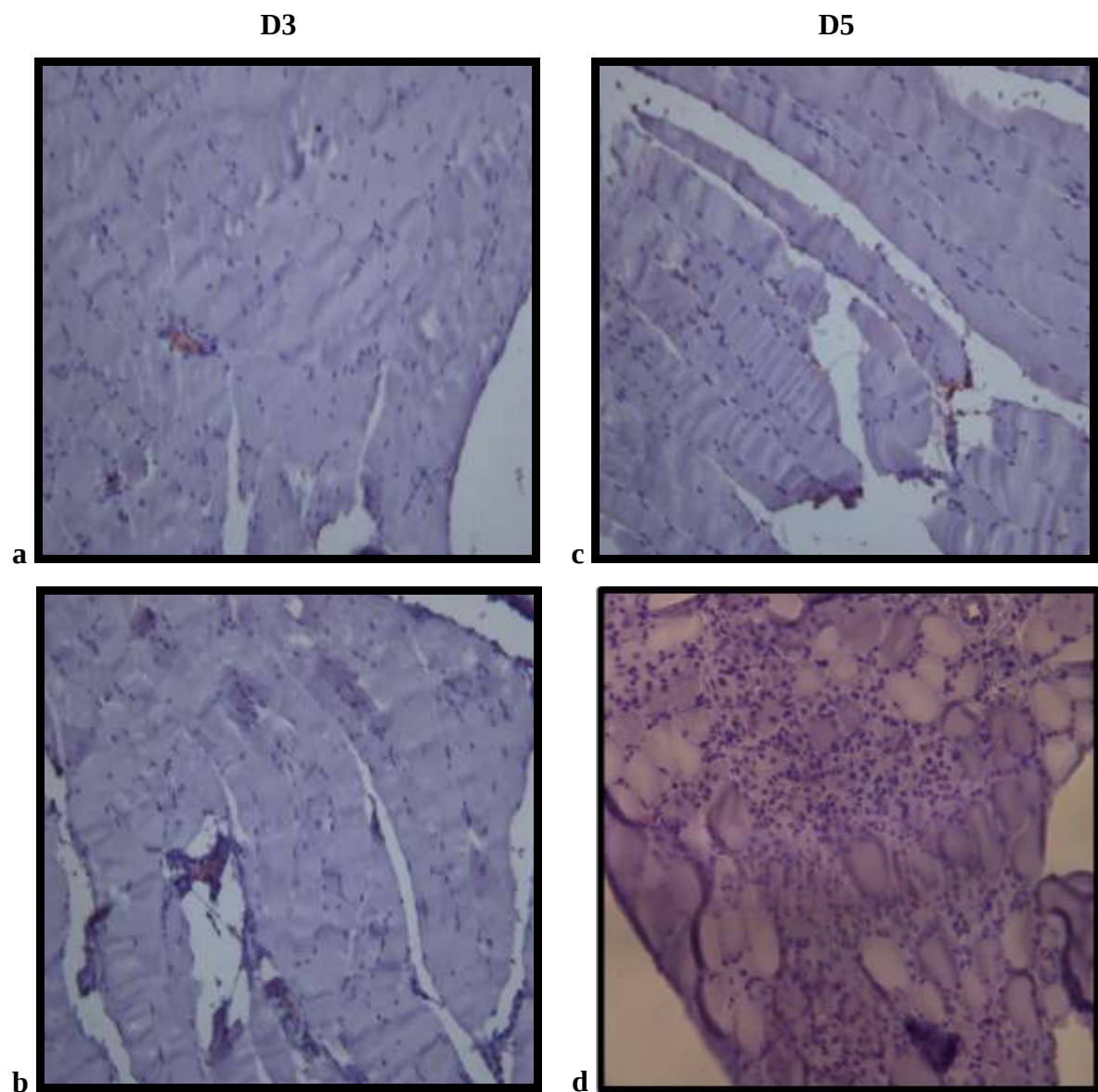
Ειδικότερα η διήθηση των μακροφάγων και στα αγρίου τύπου ζώα φαίνεται να έχει μία αύξουσα εξέλιξη στο χρόνο. Ιδιαίτερα σημαντικές φαίνονται να είναι η D5 όπου παρατηρείται αύξηση των παρατηρηθέντων μακροφάγων και η D7 όπου και παρατηρείται και στατιστικά σημαντική αύξηση των παρατηρηθέντων μακροφάγων (Εικ. 31).



Εικόνα 31. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiBisch (a) και Bisch (e) για τη μετεγχειρητική ημέρα D1 (μεγέθυνση X40).

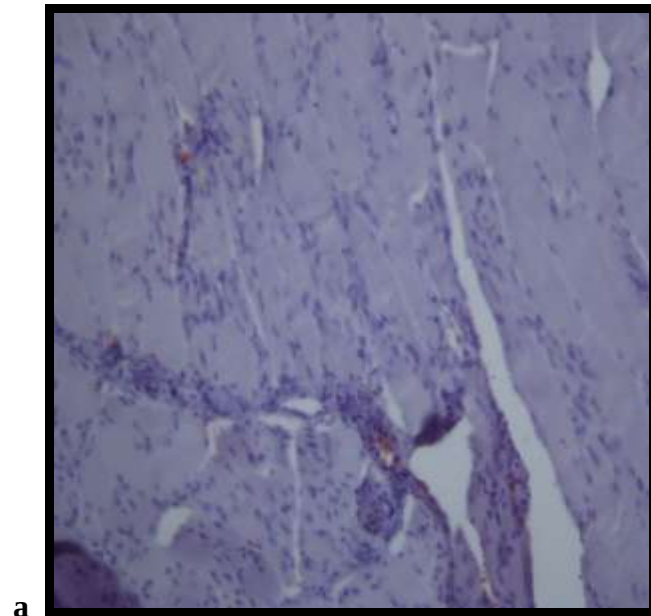
Την D1 και D3 δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση των παρατηρηθέντων μακροφάγων, εικόνα που αλλάζει κατά την D5 και διαφοροποιείται πλήρως την μετεγχειρητική ημέρα D7. Την D7 ο γαστροκνήμιος μυς φαίνεται να φλεγμαίνει περισσότερο από τις προηγούμενες ημέρες.

Δεν φαίνεται επίσης να υπάρχει επίδραση της σιλοσταζόλης στο ποσοστό θετικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος στα αγρίου ζώα όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch ($p > 0,05$) κατά την τρίτη (D3) και πέμπτη (D5) μετεγχειρητικές ημέρες. Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a, c) και Nisch (b, d) (Εικ. 32).

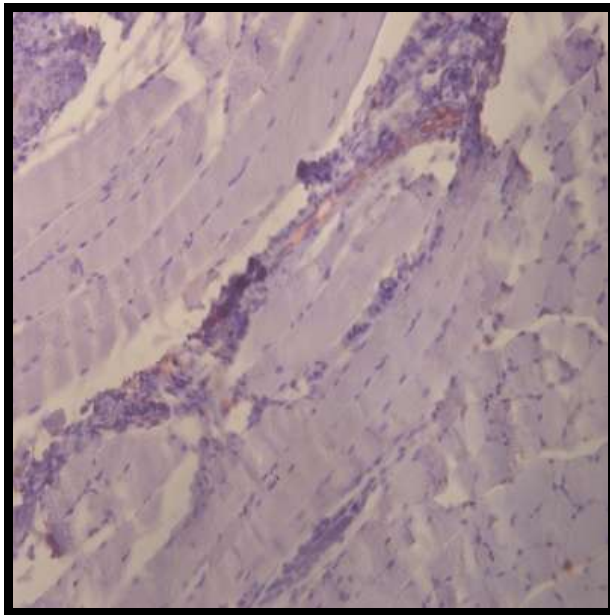


Εικόνα 32. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiNisch (b, c) και Nisch (f, g) για τις μετεγχειρητικές ημέρες D3 και D5 (μεγέθυνση X40).

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των μακροφάγων στα ανοσοανεπαρκή ζώα κατά την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα (D7) όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch ($p < 0,05$). Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiBisch (a) και Bisch (b) (Εικ. 33).



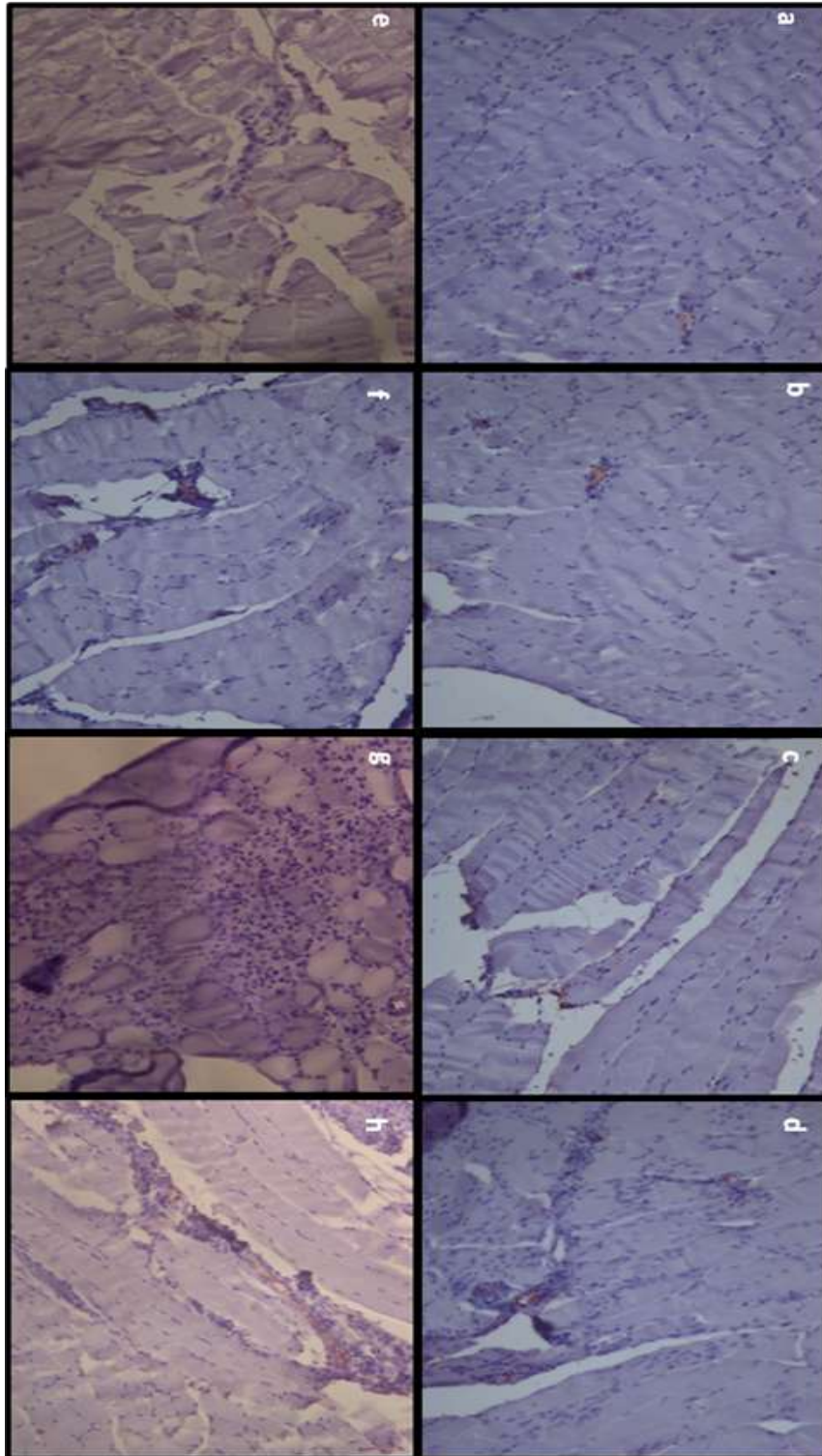
a



b

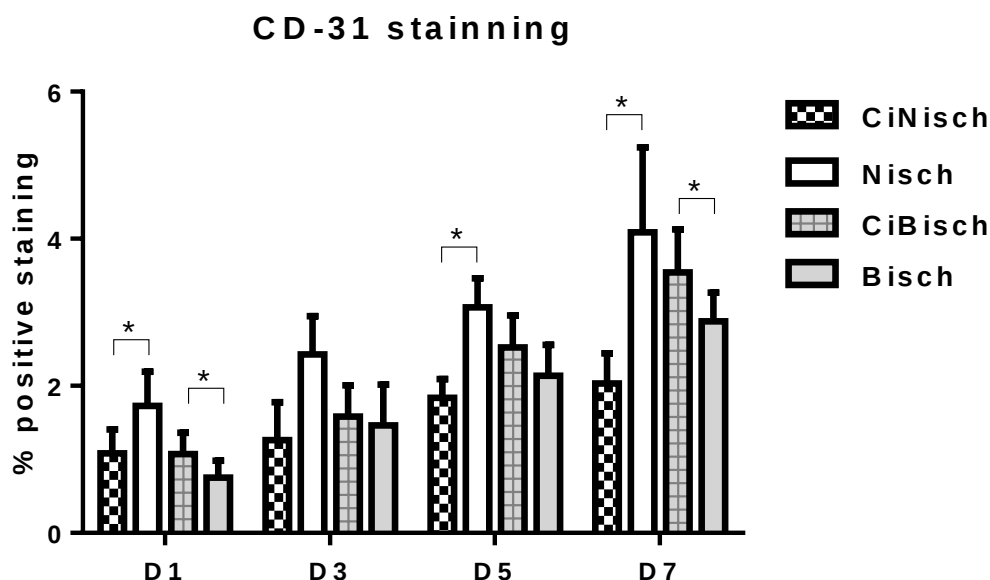
Εικόνα 33. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μύος για τις ομάδες CiBisch (a) και Bisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D7 (μεγέθυνση X40).

Προς σύγκριση, παρουσιάζεται συγκεντρωτικό πάνελ εικόνων για τις ομάδες CiBisch και Bisch όπου απεικονίζεται η διήθηση των μικροφάγων που ανιχνεύθηκαν έναντι του anti-Mac-3 αντισώματος στο δεξί γαστροκνήμιο μυ (Εικ. 34).



Εικόνα 34 a, h. Ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα έναντι μακροφάγων για CiBisch (ομάδες α-ά) και Bisch (ομάδες e-h). Οι τομές αντισταθμίστηκαν με H & E (20x). Οι αριθμοί μακροφάγων αξιολογήθηκαν σε κάθε μετεγχειρητική ημέρα (D1: a & e · D3: b & f · D5: c & g · D7: d & h).

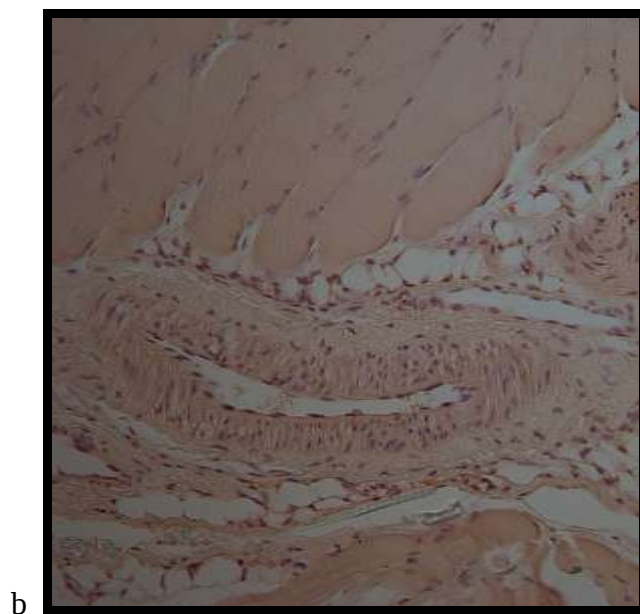
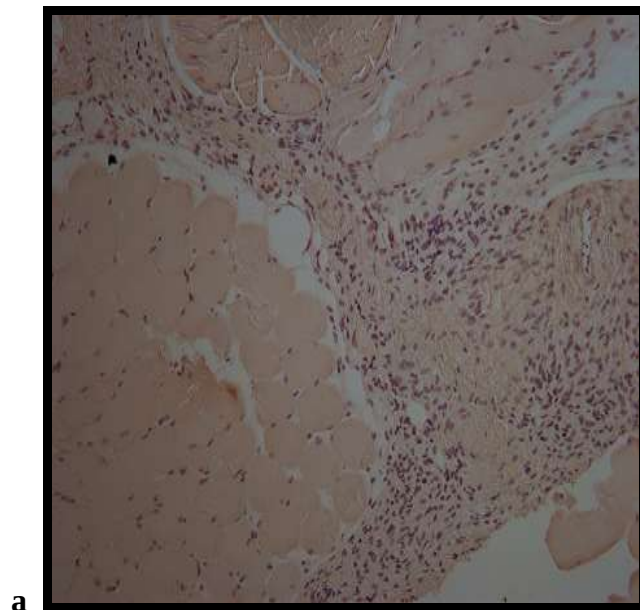
Αναφορικά με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος μετρήθηκε το ποσοστό θετικής χρώσης σε 20 πεδία ανά ιστολογικό δείγμα. Με καφέ χρώμα εμφανίζεται η θετική χρώση έναντι του anti-CD31 αντισώματος. Ειδικότερα η παρουσία του CD31 υποδοχέα στα ανοσοανεπαρκή ζώα ανεξαρτήτως της χορήγησης σιλοσταζόλης φαίνεται να έχει μία αύξουσα εξέλιξη με το χρόνο. Το ποσοστό θετικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος κατέδειξε σημαντικά στατιστική αύξηση στα ανοσοανεπαρκή ζώα της ομάδας Nisch έναντι της ομάδας CiNisch κατά την πρώτη (D1) ($p < 0,05$), πέμπτη (D5) ($p < 0,05$) και έβδομη (D7) μετεγχειρητικές ημέρες ($p < 0,01$) (Εικ. 35).



Εικόνα 35. Το ποσοστό θετικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος μετρήθηκε σε όλες τις πειραματικές ομάδες τις μετεγχειρητικές ημέρες D1, D3, D5 και D7. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των θετικών ποσοστών χρώσης στην ομάδα Nisch έναντι της ομάδας CiNisch στις D1, D5 και D7 ($p < 0,05$), ενώ στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού θετικής χρώσης παρατηρήθηκε στην ομάδα CiBisch συγκρινόμενη με την Bisch στις D1 και D7 ($p < 0,05$).

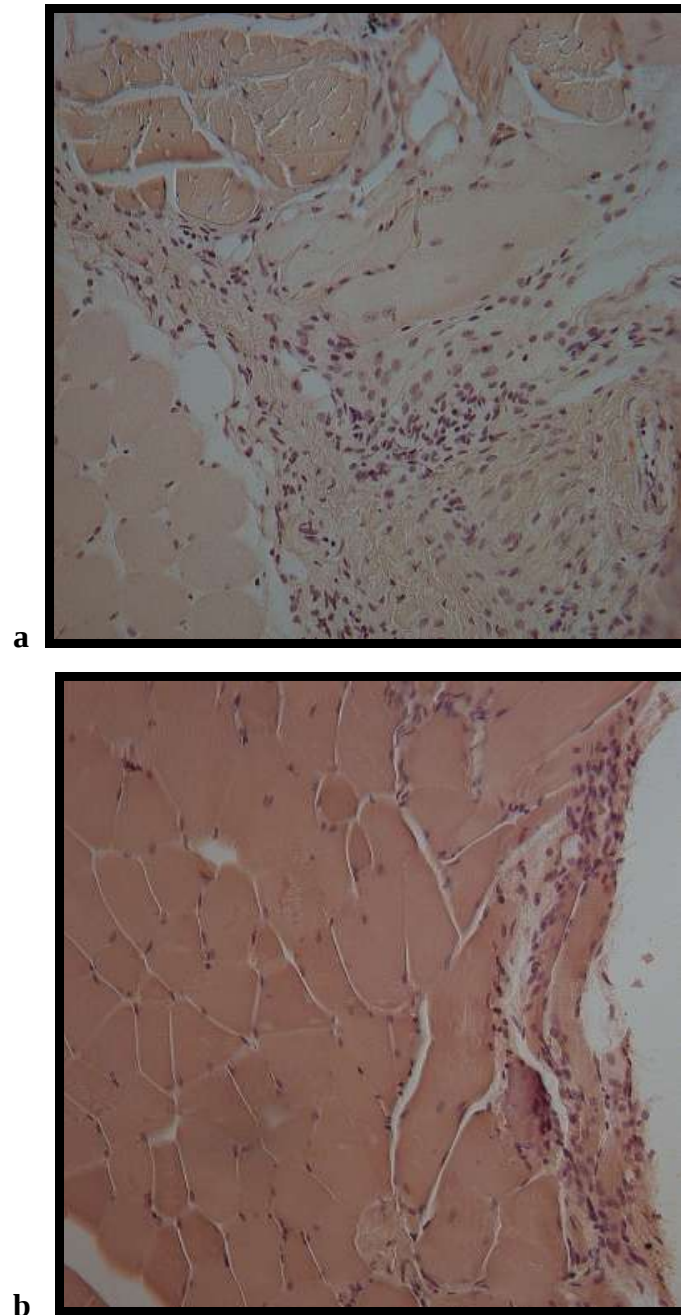
Ακολουθούν χαρακτηριστικές φωτογραφίες του ιστού για την ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του anti-CD31 αντισώματος για τα ανοσοανεπαρκή αλλά και τα αγρίου τύπου ζώα.

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του CD31 υποδοχέα στα ανοσοανεπαρκή ζώα κατά την πρώτη (D1) μετεγχειρητική ημέρα όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p < 0,05$). Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a) και Nisch (e) (Εικ. 36).



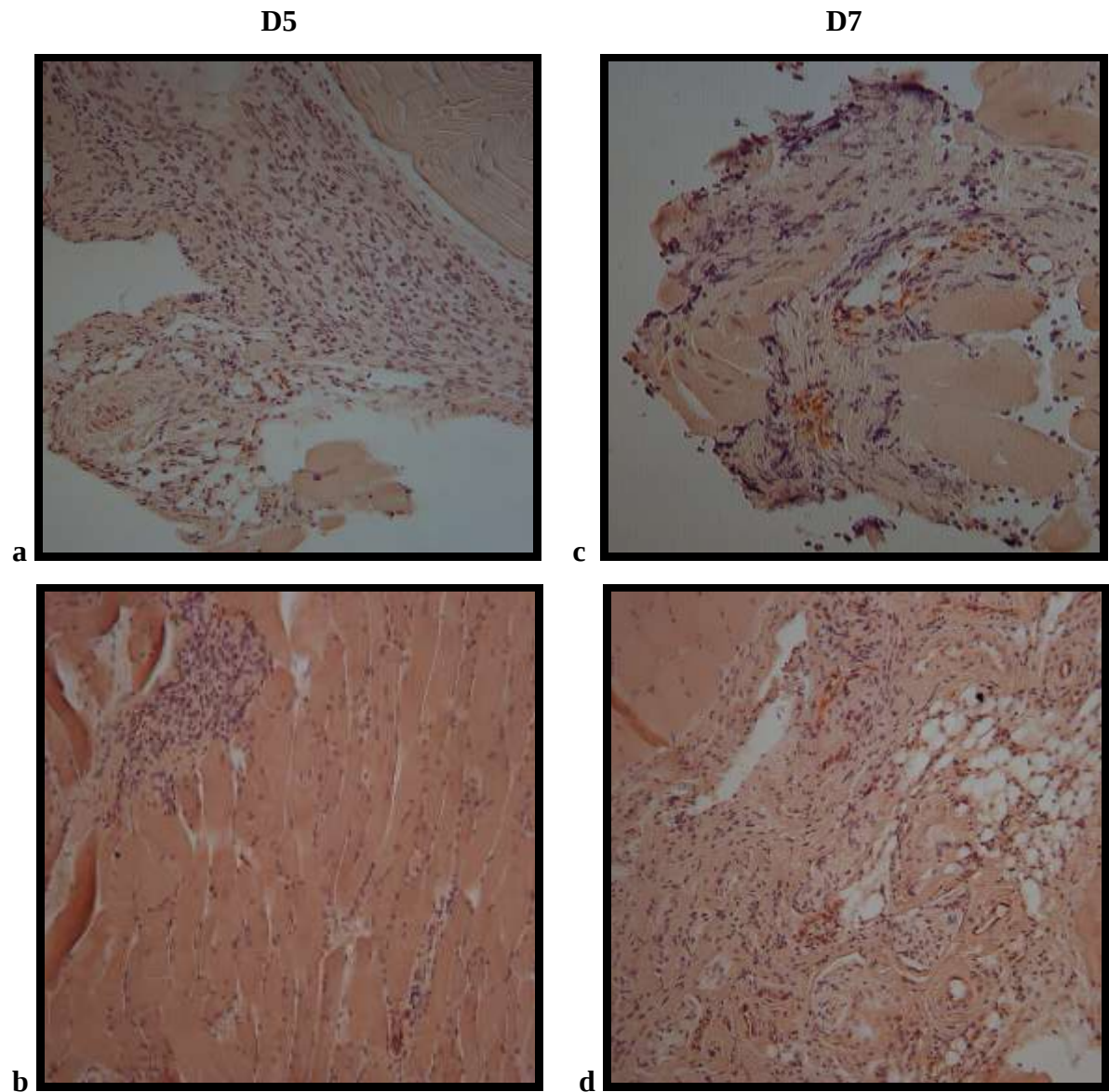
Εικόνα 36. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiNisch (a) και Nisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D1 (μεγέθυνση X20).

Παρατηρείται μη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του CD31 υποδοχέα στα ανοσοανεπαρκή ζώα κατά την τρίτη (D3) μετεγχειρητική ημέρα όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p > 0,05$). Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a) και Nisch (b) (Εικ. 37).



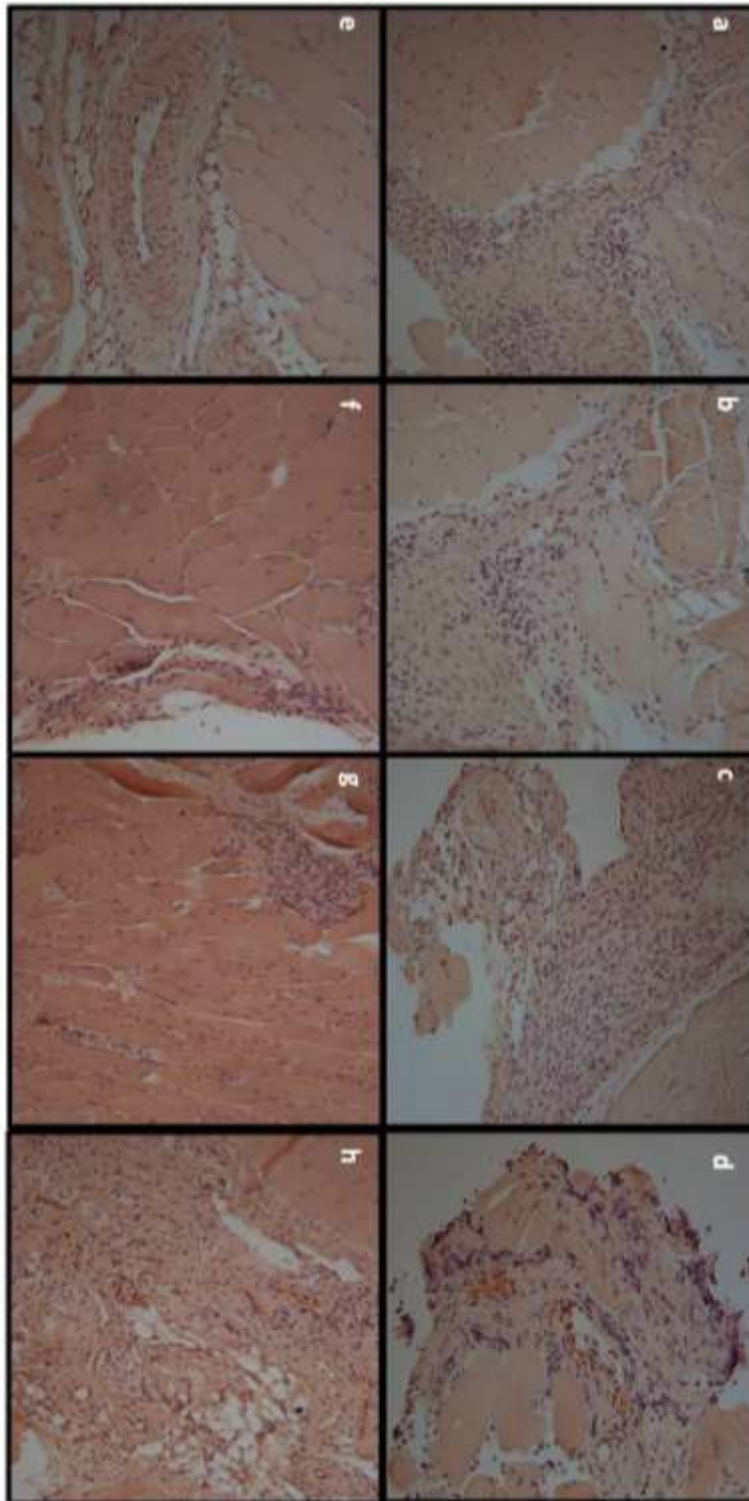
Εικόνα 37. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiNisch (a) και Nisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D3 (μεγέθυνση X20).

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του CD31 υποδοχέα στα ανοσοανεπαρκή ζώα κατά την πέμπτη (D5) και έβδομη (D7) μετεγχειρητικές ημέρες όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiNisch και Nisch ($p < 0,05$) και ($p < 0,01$) αντίστοιχα. Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a, b) και Nisch (c, d) (Εικ. 38).



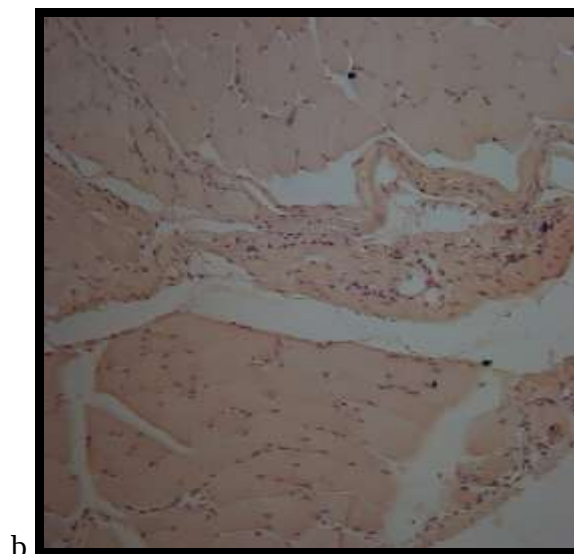
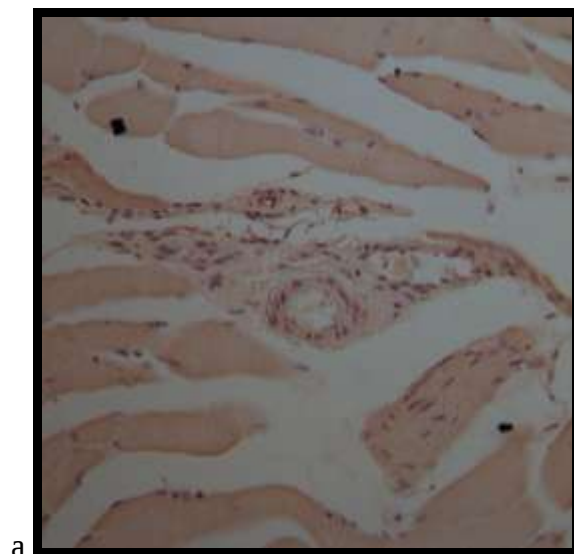
Εικόνα 38. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiNisch (a, c) και Nisch (b, d) για τις μετεγχειρητικές ημέρες D5 και D7 (μεγέθυνση X20).

Συγκεντρωτικό πάνελ εικόνων για τις ομάδες CiNisch και Nisch όπου απεικονίζεται η εξέλιξη της θετικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος που ανιχνεύθηκε στο δεξί γαστροκνήμιο μυ.



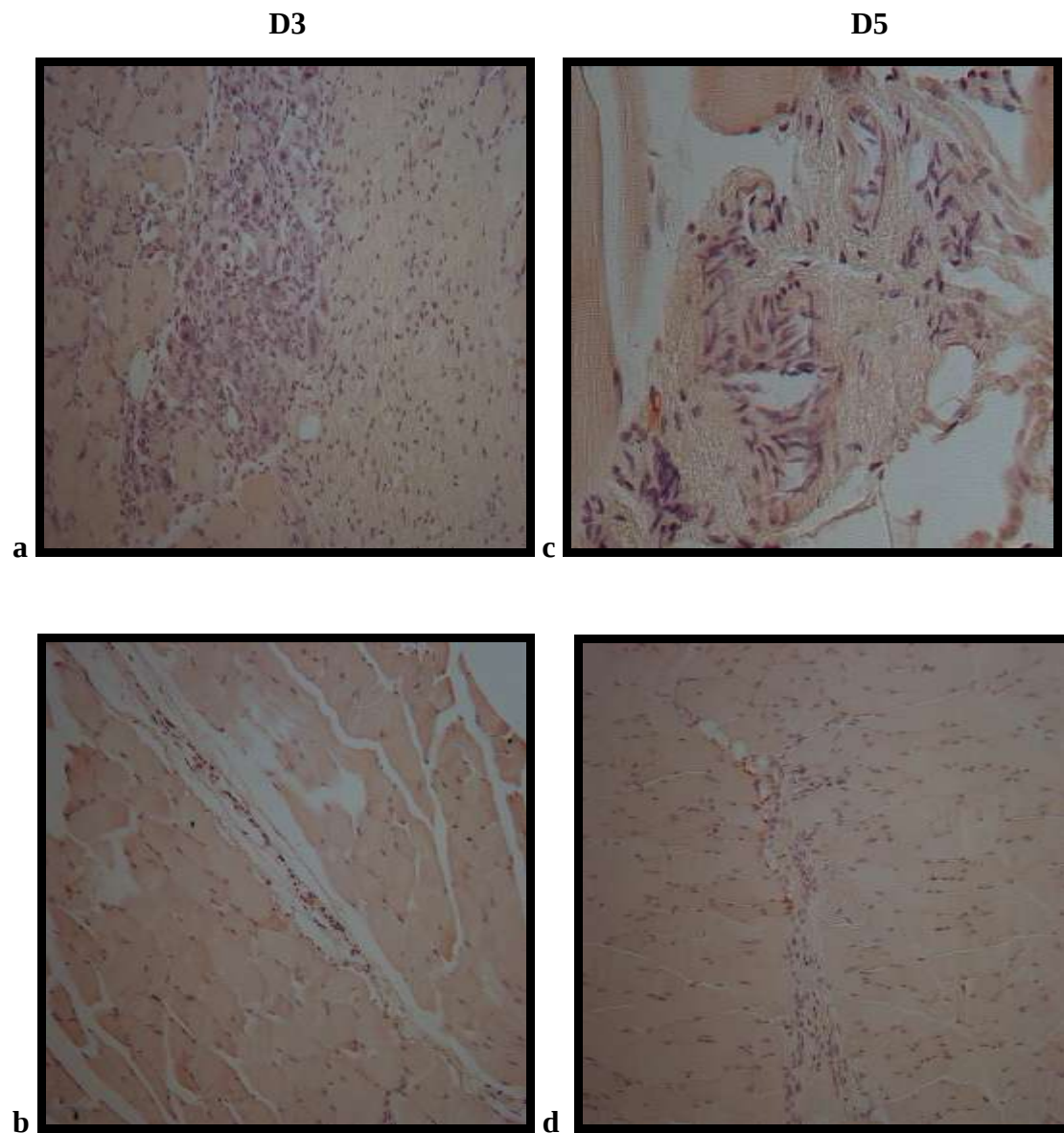
Εικόνα 39. Ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα έναντι anti-CD31 για CiNisch (ομάδες a-d) και Nisch (ομάδες e-h). Οι τομές αντισταθμίστηκαν με H & E (20x). Οι αριθμοί μακροφάγων αξιολογήθηκαν σε κάθε μετεγχειρητική ημέρα (D1: a & e · D3: b & f · D5: c & g · D7: d & h).

Αναφορικά με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος μετρήθηκε το ποσοστό θετικής χρώσης σε 20 πεδία ανά ιστολογικό δείγμα. Με καφέ χρώμα εμφανίζεται η θετική χρώση έναντι του anti-CD31 αντισώματος. Ειδικότερα η παρουσία του CD31 υποδοχέα στα αγρίου τύπου ζώα ανεξαρτήτως της χορήγησης σιλοσταζόλης φαίνεται να έχει μία αύξουσα εξέλιξη στο χρόνο. Το ποσοστό θετικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος κατέδειξε σημαντικά στατιστική αύξηση στα αγρίου τύπου ζώα της ομάδας CiBisch έναντι της ομάδας Bisch κατά την πρώτη (D1) ($p < 0,05$) και έβδομη (D7) μετεγχειρητικές ημέρες ($p < 0,01$) (Εικ. 40).



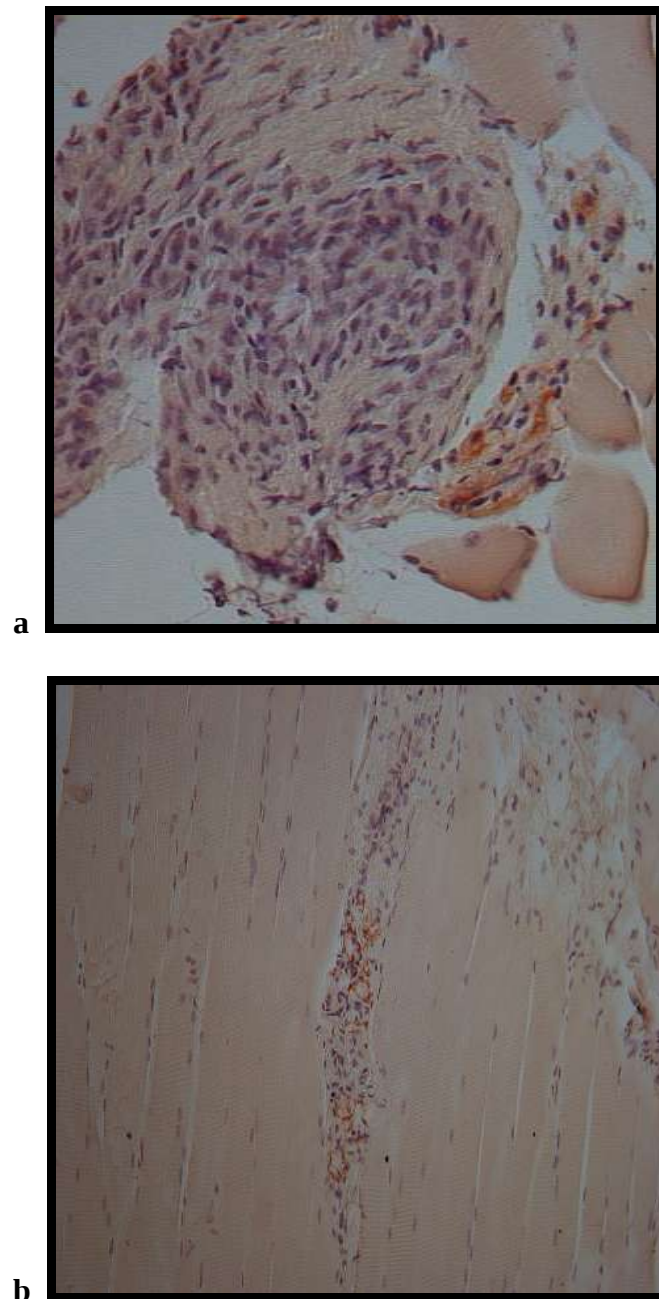
Εικόνα 40. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiBisch (a) και Bisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D1 (μεγέθυνση X20).

Παρατηρείται μη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του CD31 υποδοχέα στα ανοσοανεπαρκή ζώα κατά την τρίτη (D3) και πέμπτη (D5) μετεγχειρητικές ημέρες όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch (D3 $p > 0,05$, D5 $p > 0,05$). Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiNisch (a, c) και Nisch (b, d) (Εικ. 41).



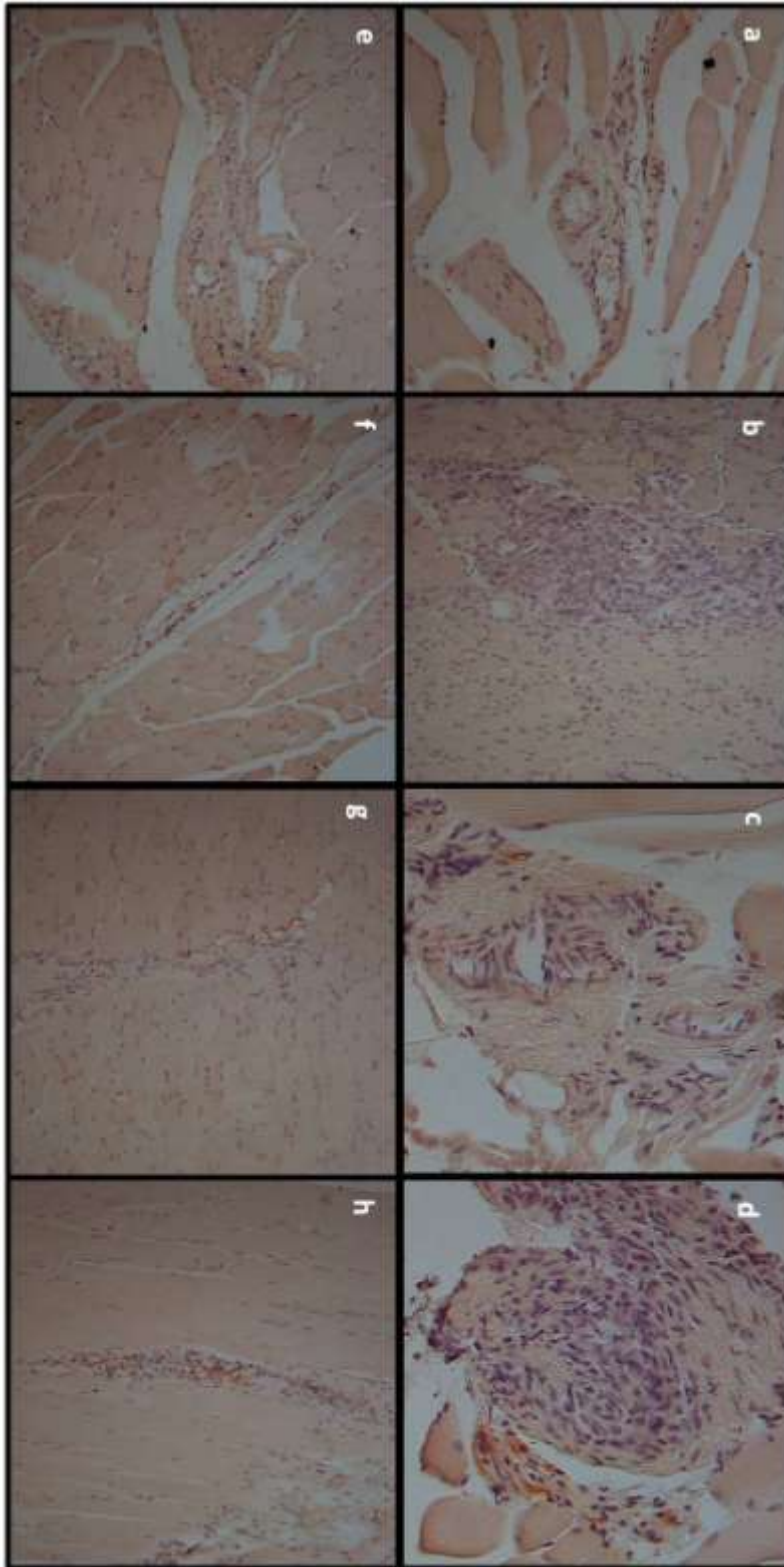
Εικόνα 41. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiBisch (a, c) και Bisch (b, d) για τις μετεγχειρητικές ημέρες D3 και D5 (μεγέθυνση X20).

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του CD31 υποδοχέα στα αγρίου τύπου ζώα κατά την έβδομη (D7) μετεγχειρητική ημέρα όπως αυτή προκύπτει από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων CiBisch και Bisch ($p < 0,05$). Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες των ομάδων CiBisch (a) και Bisch (b) (Εικ. 42).



Εικόνα 42. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος του δεξιού γαστροκνημίου μυός για τις ομάδες CiBisch (a) και Bisch (b) για τη μετεγχειρητική ημέρα D1 (μεγέθυνση X20).

Συγκεντρωτικό πάνελ εικόνων για τις ομάδες CiNisch και Nisch όπου απεικονίζεται η εξέλιξη της θετικής χρώσης έναντι του anti-CD31 αντισώματος που ανιχνεύθηκε στο δεξί γαστροκνήμιο μυ (Εικ. 43).



Εικόνα 24. Ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα έναντι anti-CD31 για CiBisch (ομάδες a-d) και Bisch (ομάδες e-h). Οι τομές αντισταθμίστηκαν με H & E (20x). Οι αριθμοί μακροφάγων αξιολογήθηκαν σε κάθε μετεγχειρητική ημέρα (D1: a & e, D3: b & f, D5: c & g, D7: d & h).

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν αφενός να διερευνηθούν οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εξέλιξη της αγγειογένεσης τόσο ως προς τα ποσοτικά όσο και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της. Η αγγειογένεση είναι μια φυσιολογική διεργασία που περιλαμβάνει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία ²²¹, με τα μακροφάγα ²²² και τα T λεμφοκύτταρα ²²³ να παίζουν σημαντικό ρόλο στην περιφερική αρτηριακή ισχαιμία και την επαναγγείωση. Η σιλοσταζόλη είναι ένας επιλεκτικός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 3A (PDE-3A), με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία της IC, καθώς αυξάνει την απόσταση βάδισης σε ασθενείς με IC ²²⁴. Η σιλοσταζόλη δρα στα αιμοπετάλια, στα αγγειακά κύτταρα των λείων μυών και στα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνοντας τα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) ²²⁵, που παίζει βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση της αγγειογένεσης και ρυθμίζει πολλαπλούς μηχανισμούς της φλεγμονής ²²⁶. Ειδικότερα, υψηλά επίπεδα cAMP αναστέλλουν την προσκόλληση λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων *in vitro* ^{227,228}, καταστέλλουν την παραγωγή IL-23 ²²⁹, ενώ αυξάνουν την παραγωγή IL-6 και IL-10 ²³⁰.

Οι κυτταρικές πηγές αυτών των κυτταροκινών είναι τα T λεμφοκύτταρα και κυρίως τα CD4⁺ (βοηθητικά T κύτταρα), και αυτό το υποσύνολο μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω στα Th1 και Th2 τύπου, ενώ οι κυτταροκίνες που παράγουν είναι γνωστές ως κυτταροκίνες τύπου Th1 (που τείνουν να προάγουν τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις) και κυτταροκίνες τύπου Th2 που εξουδετερώνουν τη μεσολαβούμενη από Th1 δράση. Ωστόσο, η ακριβής εκτίμηση της ανοσολογικής ενεργοποίησης είναι αρκετά πολύπλοκη, καθώς περιλαμβάνει έναν μακρύ κατάλογο κυτταροκινών όπως ο TNF, η IFN-γ, οι IL-1, IL-2, IL-6 και IL -10 ²³¹.

Η μοριακή απεικόνιση αγγειογόνων βιοδεικτών μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για την ανίχνευση της αγγειογένεσης τόσο στη φυσική επαναγγείωση όσο και στην απόκριση σε προ-αγγειογενετικές θεραπείες. Συγκεκριμένα, οι ιντεγκρίνες κυτταρικής προσκόλλησης έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες νεοαγγειακού πολλαπλασιασμού αφού ελέγχουν τη μετανάστευση και την εισβολή των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ιντεγκρίνη ανβ3 είναι ιδανικά κατάλληλη για την

ανίχνευση της αγγειογένεσης επειδή η έκφραση του υποδοχέα της ανβ3 ιντεγκρίνης αυξάνει γρήγορα κατά την ισχαιμία στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντιθέτως, ο υποδοχέας απουσιάζει από τα αδρανή ενδοθηλιακά κύτταρα και υπάρχει σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά αγγεία ²³².

Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλαπλοί ιχνηθέτες ιντεγκρίνης ανβ3 σε διαφορετικές μορφές απεικόνισης (όπως το PET-scan με Gallium-Ga) για την παροχή οπτικών πληροφοριών για την αγγείωση, όχι μόνο στην ογκολογία ²³³, αλλά και σε άλλες κλινικές εφαρμογές όπου η αγγειογένεση μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την πρόοδο ασθενειών, όπως η PAD και το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ²³⁴.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της σιλοσταζόλης στην αγγειογένεση αλλά και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ανοσοανεπαρκή (με γνωστές ανοσοανεπάρκειες) και αγρίου τύπου ζώα. Απ' όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά μηχανιστικά την επίδραση της σιλοσταζόλης στη φλεγμονή και την αγγειογένεση κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της πειραματικής περιφερικής αρτηριακής ισχαιμίας. Σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια με ισχαιμία στο πίσω άκρο, η θεραπεία με σιλοσταζόλη συσχετίστηκε με την καταστολή της φλεγμονής και της αγγειογένεσης, ενώ σε ποντίκια αγρίου τύπου η θεραπεία με σιλοσταζόλη προκάλεσε αγγειογένεση και άμβλυνε τη φλεγμονώδη απόκριση.

Πραγματοποιήσαμε μια παραλλαγή του πειραματικού πρωτοκόλλου του Goto ²³⁵, προκαλώντας τη μικρότερη δυνατή ισχαιμική βλάβη, προκειμένου να αποφευχθεί η θνησιμότητα των ζώων με ανοσοανεπάρκεια. Η σοβαρότητα της ισχαιμίας επιβεβαιώθηκε με την κλινική και λειτουργική αξιολόγηση του χειρουργημένου άκρου. Η κλινική αξιολόγηση του άκρου δεν αποκάλυψε καμία νέκρωση ή ισχαιμική βλάβη, ενώ η αξιολόγηση της λειτουργικότητας τόσο στον οριζόντιο άξονα (βαθμολόγηση Tarlov) όσο και στον κατακόρυφο άξονα (δοκιμή πόλου) αποκάλυψε δυσλειτουργία και στις 5 πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες.

Ο σταδιακά μειούμενος χρόνος, κατά τη διάρκεια των 7 μετεγχειρητικών ημερών, που απαιτούνταν για να κατέβουν τα ζώα από τη δοκό επικυρώνει το λειτουργικό έλλειμμα του άκρου. Το οπίσθιο άκρο του ποντικού έχει ένα καλά αναπτυγμένο παράπλευρο αγγειακό σύστημα και αποδεικνύεται ότι έχει εξαιρετικά υψηλή αντοχή στην ισχαιμία ²³⁶. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οπίσθιο άκρο τροφοδοτείται με παράπλευρη κυκλοφορία μέσω της εν τω βάθει μηριαίας αρτηρίας και άλλων κλάδων, επομένως, όπως αναμενόταν, η απόφραξη της μηριαίας αρτηρίας δεν

προκάλεσε σοβαρή ισχαιμία ²³⁷. Επιπλέον, χωρίς καμία θεραπεία, οι ποντικοί ανέκτησαν πλήρη λειτουργικότητα του ποδιού μετά την πρώτη μετεγχειρητική εβδομάδα.

Τέλος, εξετάσαμε το γαστροκνήμιο μυ ως προς την *in vivo* αγγειογένεση σε πρώιμα στάδια με ανίχνευση του υποδοχέα της ανβ3 ιντεγκρίνης με ⁶⁸Ga-NODAGA-RGDfK και με ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του υποδοχέα CD31. Το PET-scan με ⁶⁸Ga-NODAGA-RGDfK είναι μια πολύ ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος ποσοτικής αξιολόγησης της ανάπτυξης της αγγειογένεσης σε αντίθεση με την ημιποσοτική μέθοδο της ιστολογικής ανίχνευσης σχηματισμού νέων αγγείων με τη χρήση του anti-CD31 αντίσωματος. Σε αυτό το πλαίσιο, υποθέσαμε ότι ο απομακρυσμένος ισχαιμικός ιστός παρέχει πιο ακριβείς εκφράσεις αγγειογένεσης στην περιφερική αρτηριακή νόσο.

Όσον αφορά τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του φαρμάκου, αποφασίστηκε να δοκιμαστούν σε δύο διαφορετικά ανοσολογικά περιβάλλοντα. Το προφίλ της έκκρισης των κυτταροκινών και της ιστολογικής εξέτασης ήταν οι δείκτες μας για την αξιολόγηση του φαρμάκου. Υπάρχουν διάσπαρτες αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση των αναστολέων της PDE στην ενεργοποίηση των πλασματοκυττωειδών δένδριτικών κυττάρων, την αναστολή του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων και την παραγωγή IFN-γ, IL-17 και TNF-α ²³⁸ και τη μείωση του διαλυτού υποδοχέα-1 του παράγοντα νέκρωσης όγκων (sTNFRI) μετά τη χορήγηση πεντοξυφυλλίνης σε ασθενείς με λοίμωξη HIV ²³⁹.

Βάσει πειραματικού σχεδιασμού ελέγξαμε επίσης και τη συμβολή του ανοσοποιητικού συστήματος στις πιθανές επιδράσεις της σιλοσταζόλης στην αγγειογένεση. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε ένα ζωικό μοντέλο ανοσοανεπάρκειας (που στερείται λειτουργικών B και T λεμφοκυττάρων). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αγγειογένεση έχει βρεθεί να επιβραδύνεται σε αθυμικούς C57BL/6J-nu ποντικούς, όταν η μηριαία αρτηριακή εκτομή οδήγησε σε εκτεταμένη νέκρωση των άκρων μέσα σε 10 ημέρες. Η ανάκτηση της ροής του αίματος παρέμεινε σοβαρά μειωμένη, με αποτέλεσμα τη νέκρωση των άκρων σε μεταγενέστερο χρόνο. Η μελέτη αυτή επισήμανε τη συμβολή της διήθησης των T κυττάρων στην αγγειογένεση σε σοβαρό ισχαιμικό περιβάλλον των άκρων που οδηγεί σε νέκρωση.

Παρομοίως, άλλα ανοσοανεπαρκή ζωικά μοντέλα αρτηριογένεσης, δηλαδή ποντικοί C57BL/6 CD4^{-/-} ²⁴⁰ και CD8^{-/-} ²⁴¹, εμφάνισαν μειωμένη παράπλευρη ροή σε σύγκριση με τις ομάδες άγριου τύπου, την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα D7. Τα

αποτελέσματά μας συμπληρώνουν τις προαναφερθείσες αναφορές, δεδομένου ότι πρόκειται για την πρώτη μελέτη ισχαιμίας των οπίσθιων άκρων χωρίς νέκρωση ποδιού ή δακτύλων σε ανοσοανεπαρκές ζωικό μοντέλο.

Τα ποντίκια μας με έλλειψη λειτουργικών ανοσοκυττάρων παρουσίασαν αυξημένη αγγειογενετική απόκριση στην ήπια ισχαιμία των οπίσθιων άκρων και αυτή η ανταπόκριση κατεστάλη απροσδόκητα με τη χορήγηση της σιλοσταζόλης. Όσον αφορά τις αγγειογενετικές επιδράσεις της σιλοσταζόλης μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος, επικεντρωθήκαμε στις αλλαγές της έκκρισης κυτταροκινών και τη διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα που ρυθμίζουν την αγγειογένεση σε πολύ πρώιμο στάδιο.

Προηγούμενες ενδείξεις έχουν ενοχοποιήσει την αντιφλεγμονώδη δράση της σιλοσταζόλης, η οποία έχει αναφερθεί να αναστέλλει την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων, την παρουσίαση αντιγόνου από μονοκύτταρα στο περιφερειακό αίμα⁶, τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την παραγωγή IFN- γ , IL-17 και TNF- α ²⁷. Σύμφωνα με αυτό, τα ανοσοανεπαρκή ζώα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με σιλοσταζόλη παρουσίασαν αξιοσημείωτα μειωμένη διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα στο ισχαιμικό του άκρο. Ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης μας ήταν η απότομη αύξηση των επιπέδων των TNF- α , IL-6 και IFN- γ στο αίμα λίγο μετά την έναρξη χορήγησης της σιλοσταζόλης, επίπεδα τα οποία σταδιακά μειώθηκαν μετεγχειρητικά. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη δημιουργία οξείας φλεγμονής από την σιλοσταζόλη, η οποία δεν εμμένει, αλλά απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Όσον αφορά την απουσία αντιφλεγμονώδους απόκρισης στα ζώα με ανοσοανεπάρκεια, αυτό οφείλεται προφανώς στην έλλειψη της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-4 και IL-10) και την θετική ενεργοποίηση μιας T ρυθμιστικής ανοσοαπόκρισης.

Σε ποντίκια άγριου τύπου που υποβλήθηκαν σε αγωγή με σιλοσταζόλη, βρήκαμε μια εντελώς διαφορετική απόκριση σε σύγκριση με τους αντίστοιχους ανοσοανεπαρκείς ποντικούς. Με εξαίρεση την IL-2, οι υπόλοιπες κυτταροκίνες (IL-4, IL-10, IL-6 και IFN- γ) παρουσίασαν σημαντική αύξηση. Αυτό το αποτέλεσμα εμπλέκει την αναρροϊκή ρύθμιση μιας Th2 τύπου, αντί Th1 τύπου, ανοσοαπόκρισης. Έχει αναφερθεί ότι η από του στόματος χορήγηση σιλοσταζόλης αναστέλλει την πόλωση των T κυττάρων προς τον τύπο Th1²⁴². Σε πρόσφατη μελέτη, οι ρυθμιστικές Th2 και Th17 τύπου αποκρίσεις βελτίωσαν την αγγειογένεση και την αιμάτωση του ιστού σε

ισχαιμικούς τραυματισμούς, εν μέρει λόγω της ικανότητάς τους να διεγείρουν άμεσα την ενδοθηλιακή ανάπτυξη ²⁴³. Επομένως, η επικράτηση Th1 τύπου απόκρισης σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς μπορεί να εξηγήσει τη μετατόπιση του αγγειογενετικού αποτελέσματος της σιλοσταζόλης σε αυτό το στέλεχος ποντικών, ενώ στα ισχαιμικά άγριου τύπου ζώα, η σιλοσταζόλη προώθησε την πρόκληση αγγειογένεσης πιθανώς μέσω της πόλωσης προς ανοσοδραστικότητα τύπου Th2 και της καταστολής της Th1 ανοσολογικής απόκρισης.

Η σιλοσταζόλη είναι γνωστή για τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της και αυτό επιβεβαιώθηκε στη μελέτη μας με την καταρροϊκή ρύθμιση της διήθησης φλεγμονωδών κυττάρων σε όλες τις ομάδες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία. Φαίνεται ότι εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της, η σιλοσταζόλη μπορεί να προκαλέσει Th2 τύπου απόκριση έναντι της Th1, όπως απεικονίζεται από τις συνεχόμενα υψηλές συγκεντρώσεις της IFN- γ και άλλων κυτταροκινών (π.χ., IL-6, TNF- α) που μεσολαβούν στην προαγωγή της αγγειογένεσης. Σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς όπου η απόκριση Th1/Th2 απουσιάζει, η σιλοσταζόλη μπορεί ακόμη να προκαλέσει αγγειακή παλινδρόμηση. Απουσία Th2 απόκρισης, η ενδοθηλιακή ανάπτυξη δε ρυθμίζεται κατάλληλα, οδηγώντας πιθανώς σε μη λειτουργική αγγειογένεση και χαμηλότερη ροή αίματος, όπως αναφέρεται σε διάφορες εργασίες.

Η ασυμφωνία των ευρημάτων μεταξύ ζώων με ανοσοανεπάρκεια και άγριου τύπου στην παρούσα μελέτη μπορεί επίσης να σχετίζεται με τον διαφορούμενο ρόλο της IFN- γ . Σε μερικές μελέτες η IFN- γ επάγει την αγγειακή παλινδρόμηση μόνο στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα στο αγγειακό σύστημα των όγκων και όχι σε προϋπάρχοντα φυσιολογικά αιμοφόρα αγγεία ²⁴⁴, ενώ ενισχύει την αγγειογένεση παρουσία προ-αγγειογενετικών M1 μακροφάγων ²⁴⁵. Σε άλλες μελέτες οι αποκρίσεις M1/Th1 θεωρούνται «αντι-αγγειογόνες» ²⁴⁶, ενώ άλλες έχουν δείξει ότι τα M1 μακροφάγα είναι προ-αγγειογόνα ²⁴⁷. Δεν είναι σαφές εάν τα κατασταλμένα μακροφάγα στις ομάδες που υποβλήθηκαν σε αγωγή με σιλοσταζόλη ήταν προ- ή αντι-αγγειογόνα.

Η ιστολογική ανάλυση παρουσίασε ένα κοινό πρότυπο σταδιακής ελάττωσης της διήθησης μακροφάγων που κορυφώθηκε την D7, ένα φαινόμενο που ήταν πιο έντονο στα ανοσοανεπαρκή ζώα απ' ότι στα άγριου τύπου. Συγκεκριμένα, στους ανοσοανεπαρκείς ποντικούς, η σιλοσταζόλη είχε μεγαλύτερη επίδραση στη μείωση της παρατηρούμενης φλεγμονής, μειώνοντας σημαντικά την έκταση της διήθησης από μακροφάγα.

Παρόλο που προσπαθήσαμε να σχεδιάσουμε το βέλτιστο μοντέλο για τον έλεγχο της επίδρασης της σιλοσταζόλης στην περιφερική ισχαιμία, η μελέτη μας έχει σημαντικούς περιορισμούς. Πρώτον, σε σχέση με την ηλικία και την κατάσταση της υγείας των ζώων, η μελέτη μας διεξήχθη σε υγιή νεαρά ποντίκια, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις σοβαρής PAD, οι ασθενείς είναι ηλικιωμένοι και η PAD συνοδεύεται από υποκείμενες ασθένειες όπως ο διαβήτης, η υπερχοληστερολαιμία και η υπέρταση. Η αναγωγή των ευρημάτων μας στον άνθρωπο πρέπει να γίνει με προσοχή, καθώς δεν υπάρχει μεταβολή στην παράπλευρη κυκλοφορία στα ποντίκια, ενώ ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ανθρώπων ²⁴⁸. Δεύτερον, στο στέλεχος BALB/c, η διακύμανση μεταξύ των ζώων δεν εντοπίζεται πάντοτε λόγω της συγγενικής τους ανατομικής ομοιότητας. Τρίτον, δεν αξιολογήσαμε τη λειτουργική ικανότητα των διηθητικών φλεγμονωδών κυττάρων που θα μπορούσαν να αναδείξουν καλύτερα την επίδραση της σιλοσταζόλης στην πόλωση Th1 έναντι Th2 τύπου απόκρισης.

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η σιλοσταζόλη φαίνεται να καταστέλλει την παραγωγή της IL-2 ενώ αντίθετα προάγει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών σε άγριου τύπου ζώα. Η καταστολή της IL-2 οδηγεί σε αλλαγή του τύπου ανοσολογικής απόκρισης γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για την αντιμετώπιση της φλεγμονής.

Στα ανοσοανεπαρκή ζώα η σιλοσταζόλη φαίνεται να βοηθά στη βελτίωση της ανοσοαπόκρισης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η ελλείψη της ρύθμισης έκκρισης της IL-2 (η οποία είναι απύσχα) αυξάνει την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και της IFN- γ , ενδείξεις όμως που πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Αναφορικά με την επίδραση της σιλοσταζόλης στην αγγειογένεση στα άγριου τύπου ζώα, φαίνεται ότι αυτή επιδρά θετικά στην έκφραση του CD-31 υποδοχέα άρα και στην αγγειογένεση την πρώτη και έβδομη μετεγχειρητική ημέρα επικυρώνοντας τη μη στατιστικά αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα της $\alpha_v\beta_3$ ιντεργκρίνης.

Στα ανοσοανεπαρκή ζώα η επιδράση της σιλοσταζόλης στην αγγειογένεση, φαίνεται να είναι αρνητική αφού φαίνεται να μειώνει την έκφραση τόσο του υποδοχέα της ιντεργκρίνης $\alpha_v\beta_3$ όσο και του CD-31 υποδοχέα, για όλες τις μετεγχειρητικές ημέρες πλην της τρίτης (D3).

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα εμφανίζουν μια ενδιαφέρουσα πλειοτροπική δράση της σιλοσταζόλης και επαληθεύουν την αρχική ερευνητική υπόθεση περι επίδρασής της όχι μόνο στα ενδοθηλιακά αλλά και στα ανοσολογικά κύτταρα. Περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα χορήγησης του φαρμάκου αλλά και για άλλα φάρμακα της ίδιας οικογένειας.

Βιβλιογραφία

-
- ¹ Hiatt, W.R., Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med*, 2001. 344(21): p. 1608-21.
- ² Dormandy, J.A. and R.B. Rutherford, Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg*, 2000. 31(1 Pt 2): p. S1-S296.
- ³ Garcia, L.A., Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease. *J Endovasc Ther*, 2006. 13 Suppl 2: p. II3-9.
- ⁴ Criqui, M.H., et al., The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*, 1985. 71(3): p. 510-5.
- ⁵ Soder, H.K., et al., Prospective trial of infrapopliteal artery balloon angioplasty for critical limb ischemia: angiographic and clinical results. *J Vasc Interv Radiol*, 2000. 11(8): p. 1021-31 *Eur Heart J*. 2006; 27: 1610-1619.
- ⁶ Siablis, D., et al., Sirolimus-eluting versus bare stents after suboptimal infrapopliteal angioplasty for critical limb ischemia: enduring 1-year angiographic and clinical benefit. *J Endovasc Ther*, 2007. 14(2): p. 241-50.
- ⁷ Siablis, D., et al., Sirolimus-eluting versus bare stents for bailout after suboptimal infrapopliteal angioplasty for critical limb ischemia: 6-month angiographic results from a nonrandomized prospective single-center study. *J Endovasc Ther*, 2005. 12(6): p. 685-95.
- ⁸ Folkman, J., 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*, 82(1), pp.4-6.
- ⁹ Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), pp.932-936.
- ¹⁰ Risau, W. and V. Lemmon, Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol*, 1988. 125(2):p. 441-50.
- ¹¹ Jaffe, E.A., et al., Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, 1973. 52(11): p. 2745-56.
- ¹² Ausprunk, D.H. and J. Folkman, Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, 1977. 14(1): p. 53-65.
- ¹³ Gross, J.L., D. Moscatelli, and D.B. Rifkin, Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. 80(9): p. 2623-7.
- ¹⁴ Schoefl, G.I., Studies on Inflammation. Iii. Growing Capillaries: Their Structure and Permeability. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, 1963. 337: p. 97-141.
- ¹⁵ Weiss, L., F.W. Orr, and K.V. Honn, Interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *FASEB J*, 1988. 2(1): p. 12-21.

-
- ¹⁶ Yamagami, I., [Electron microscopic study on the cornea. I. The mechanism of experimental new vessel formation]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 1969. 73(8): p. 1222-42.
- ¹⁷ Buzney, S.M., R.N. Frank, and W.G. Robison, Jr., Retinal capillaries: proliferation of mural cells in vitro. *Science*, 1975. 190(4218): p. 985-6.
- ¹⁸ Cohen, M.P., et al., Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980. 95(2):p. 765-9.
- ¹⁹ Maragoudakis, M.E., M. Panoutsacopoulou, and M. Sarmonika, Rate of basement membrane biosynthesis as an index to angiogenesis. *Tissue Cell*, 1988. 20(4): p. 531-9.
- ²⁰ Maragoudakis, M.E., M. Sarmonika, and M. Panoutsacopoulou, Inhibition of basement membrane biosynthesis prevents angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988. 244(2): p. 729-33.
- ²¹ Maragoudakis, M.E., et al., Basement membrane biosynthesis as a target to tumor therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990. 252(2): p. 753-7.
- ²² Flint, G. and D. Harrington, New Vessel Formation in the Vitreous. *Br J Ophthalmol*, 1934. 18(1): p. 27-36.
- ²³ Hamilton, A.M., et al., Retinal new vessel formation following experimental vein occlusion. *Exp Eye Res*, 1975. 20(6): p. 493-7.
- ²⁴ Forrester, J.V., Mechanisms of new vessel formation in the retina. *Diabet Med*, 1987. 4(5): p. 423-30.
- ²⁵ Mavromatis K, Fukai T, Tate M, Chesler N, Ku DN, Galis ZS. Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1889-1895.
- ²⁶ Hiatt, W.R., Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med*, 2001. 344(21): p. 1608-21.
- ²⁷ Dormandy, J.A. and R.B. Rutherford, Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg*, 2000. 31(1 Pt 2): p. S1-S296.
- ²⁸ Garcia, L.A., Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease. *J Endovasc Ther*, 2006. 13 Suppl 2: p. II3-9
- ²⁹ Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol* 1995; 26: 450–456.
- ³⁰ Folkman, J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995. 1(1): p. 27-31.
- ³¹ Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 410–422.

-
- ³² Simons, M., Angiogenesis, arteriogenesis, and diabetes: paradigm reassessed? *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(5): p. 835-7.
- ³³ Simons, M., Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation*, 2005. 111(12): p. 1556-66.
- ³⁴ Schaper, W. and D. Scholz, Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(7): p. 1143-51.
- ³⁵ Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, 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; 261: 2814-2818.
- ³⁶ Liddell, R.P., C.R. Weiss, and L.V. Hofmann, Therapeutic angiogenesis: the next frontier for interventional radiology. *Tech Vasc Interv Radiol*, 2004. 7(1): p. 40-8.
- ³⁷ Zabner, J., Cationic lipids used in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997.27(1): p. 17-28..
- ³⁸ Yang, Y., et al., Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(10): p. 4407-11.
- ³⁹ Schratzberger, P., et al., Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle. *Mol Ther*, 2002. 6(5): p. 576-83.
- ⁴⁰ Kalka, C., et al., Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(7): p. 3422-7.
- ⁴¹ Assmus, B., et al., Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002. 106(24): p. 3009-17.
- ⁴² Edelman, E.R., M.A. Nugent, and M.J. Karnovsky, Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(4): p. 1513-7..
- ⁴³ Hiltunen, M.O., et al., Biodistribution of adenoviral vector to nontarget tissues after local in vivo gene transfer to arterial wall using intravascular and periadventitial gene delivery methods. *FASEB J*, 2000. 14(14): p. 2230-6.
- ⁴⁴ Losordo, D.W., et al., Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 1998. 98(25): p. 2800-4.
- ⁴⁵ Takeshita, S., et al., Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 1994. 93(2): p. 662-70.
- ⁴⁶ Lederman, R.J., et al., Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*, 2002. 359(9323): p. 2053-8.
- ⁴⁷ Cheresh, D.A., 1992. Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion. *Clinics in laboratory medicine*, 2015 12(2), pp.217-36.

-
- ⁴⁸ Giancotti, F.G. & Ruoslahti, E., 1999. Integrin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5430), pp.1028–1032.
- ⁴⁹ Hauck, C.R., Hsia, D. a & Schlaepfer, D.D., 2002. The focal adhesion kinase--a regulator of cell migration and invasion. *IUBMB life*, 53(2), pp.115–119.
- ⁵⁰ Parsons, J.T. & Parsons, S.J., 1997. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Current opinion in cell biology*, 9(2), pp.187–192.
- ⁵¹ Franke, T.F., Kaplan, D.R. & Cantley, L.C., 1997. PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88(4), pp.435–437.
- ⁵² Stupack, D.G. & Cheresch, D. a., 2004. Integrins and Angiogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 64, pp.207–238.
- ⁵³ Hynes, R.O., 2002. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), pp.673–687.
- ⁵⁴ Guo, W. & Giancotti, F.G., 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(10), pp.816–826.
- ⁵⁵ Giancotti, F.G., 2000. Complexity and specificity of integrin signalling. *Nature cell biology*, 2(1), pp.E13–E14.
- ⁵⁶ Lamalice, L., Le Boeuf, F. & Huot, J., 2007. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research*, 100(6), pp.782–794.
- ⁵⁷ Boudreau, N. et al., 1997. Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. *Journal of Cell Biology*, 139(1), pp.257–264.
- ⁵⁸ Haraguchi, M. et al., 2008. Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), pp.23514–23523.
- ⁵⁹ Nemeth, J. a et al., 2003. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. *Clinical & experimental metastasis*, 20(5), pp.413–420.
- ⁶⁰ Taverna, D. et al., 2004. Increased primary tumor growth in mice null for beta3- or beta3/beta5-integrins or selectins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), pp.763–768.
- ⁶¹ Reynolds, L.E. et al., 2005. Accelerated re-epithelialization in beta3-integrin-deficient-mice is associated with enhanced TGF-beta1 signaling. *Nature medicine*, 11(2), pp.167–174.
- ⁶² Weng, S. et al., 2003. Beta3 integrin deficiency promotes atherosclerosis and pulmonary inflammation in high-fat-fed, hyperlipidemic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), pp.6730–6735.
- ⁶³ Brooks, P.C., Clark, R. a & Cheresch, D. a, 1994. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5158), pp.569–571.

-
- ⁶⁴ Drake, C.J., Cheresch, D. a & Little, C.D., 1995. An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *Journal of cell science*, 108 (Pt 7, pp.2655–2661.
- ⁶⁵ Bader, B.L. et al., 1998. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell*, 95(4), pp.507–519.
- ⁶⁶ Reynolds, L.E. et al., 2002. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nature medicine*, 8(1), pp.27–34.
- ⁶⁷ Huang, X. et al., 2000. Normal development, wound healing, and adenovirus susceptibility in beta5-deficient mice. *Molecular and cellular biology*, 20(3), pp.755–759.
- ⁶⁸ Mahabeleshwar, G.H. et al., 2006. Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*, 203(11), pp.2495–2507
- ⁶⁹ Hodivala-Dilke, K., 2008. $\alpha v \beta 3$ Integrin and Angiogenesis: a Moody Integrin in a Changing Environment. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(5), pp.514–519.
- ⁷⁰ Hodivala-Dilke, K.M., Reynolds, A.R. & Reynolds, L.E., 2003. Integrins in angiogenesis: Multitalented molecules in a balancing act. *Cell and Tissue Research*, 314(1), pp.131–144.
- ⁷¹ Mikelis, C. et al., 2009. Integrin alpha(v)beta(3) is a pleiotrophin receptor required for pleiotrophin-induced endothelial cell migration through receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(5), pp.1459–1469.
- ⁷² Díaz-González, F. et al., 1996. Trans-dominant inhibition of integrin function. *Molecular biology of the cell*, 7(12), pp.1939–51.
- ⁷³ Gonzalez, A.M., Claiborne, J. & Jones, J.C.R., 2008. Integrin cross-talk in endothelial cells is regulated by protein kinase A and protein phosphatase 1. *The Journal of biological chemistry*, 283(46), pp.31849–60.
- ⁷⁴ Robinson, S.D., 2004. 3-Integrin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor-A-Dependent Permeability. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(11), pp.2108–2114.
- ⁷⁵ Weis, S.M. et al., 2007. Cooperation between VEGF and beta3 integrin during cardiac vascular development. *Blood*, 109(5), pp.1962–70.
- ⁷⁶ Hu, X. et al., 2014. Effects of integrin $\alpha v \beta 3$ on differentiation and collagen synthesis induced by connective tissue growth factor in human hypertrophic scar fibroblasts. *International journal of molecular medicine*, 34(5), pp.1323–34.
- ⁷⁷ Wang, S. et al., 2014. SB-273005, an antagonist of $\alpha v \beta 3$ integrin, reduces the production of Th2 cells and cytokine IL-10 in pregnant mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(6), pp.1677–1682.
- ⁷⁸ Somanath et al., 2009. Cooperation between integrin $\alpha v \beta 3$ and VEGFR2 in angiogenesis. *NIH Public Access*, 29(6), pp.997–1003.

-
- ⁷⁹ Borges, E., Jan, Y. & Ruoslahti, E., 2000. Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *The Journal of biological chemistry*, 275(51), pp.39867–39873.
- ⁸⁰ Sieg, D.J. et al., 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature cell biology*, 2(5), pp.249–256.
- ⁸¹ Le Boeuf, F., 2006. Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (FAK) on SER732 is induced by Rho-dependent Kinase and is essential for Proline-rich Tyrosine Kinase-2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor. *Molecular biology of the cell*, 17(2), pp.3508–3520.
- ⁸² Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 2007; 76:481-511.
- ⁸³ Essayan DM. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(5):671-80.
- ⁸⁴ Thompson, P. D., R. Zimet, et al. (2002). "Meta-analysis of results from eight randomized, placebo-controlled trials on the effect of cilostazol on patients with intermittent claudication." *Am J Cardiol* 90(12): 1314-1319..
- ⁸⁵ Dawson, D. L., B. S. Cutler, et al. (2000). "A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication." *Am J Med* 109(7):523-530.
- ⁸⁶ Hancock JT (2005). *Cell Signalling*. New York: Oxford University Press
- ⁸⁷ Gomperts BD, Kramer IM, & Tatham PE. (2002). *Signal Transduction*. USA: Elsevier Academic Press.
- ⁸⁸ Barritt GJ (1992). *Communication within animal cells*. New York: Oxford University Press Inc.
- ⁸⁹ Dremier S, Kopperud R, Doskeland SO et al. Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Lett* 2003; 546 (1):103-7.
- ⁹⁰ Cooper DM. Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylate cyclases by calcium. *Biochem Soc Trans* 2003a; 31 (Pt 5):912-5.
- ⁹¹ Lynch MJ, Baillie GS, Mohamed A et al. RNA silencing identifies PDE4D5 as the functionally relevant cAMP phosphodiesterase interacting with beta arrestin to control the protein kinase A/AKAP79-mediated switching of the beta2-adrenergic receptor to activation of ERK in HEK293B2 cells. *J Biol Chem* 2005; 280 (39):33178-89.
- ⁹² Abbas AK, & Lichtman AH (2001). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. USA: W.B. Saunders Company.
- ⁹³ Goldsby RA, Kindt TJ, & Osborne BA. (2004). *Kuby Immunology*. New York: W.H. Freeman and Company.
- ⁹⁴ Mege JL, Meghari S, Honstetter A et al. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2006; 6 (9):557-69.

-
- ⁹⁵ O'Garra A, Vieira PL, Vieira P et al. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004b; 114 (10):1372-8.
- ⁹⁶ Rouse BT. Regulatory T cells in health and disease. *J Intern Med* 2007; 262 (1):78-95.
- ⁹⁷ Taylor A, Verhagen J, Blaser K et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 2006; 117 (4):433-42.
- ⁹⁸ Wu K, Bi Y, Sun K et al. IL-10 producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 2007; 4 (4):269-75.
- ⁹⁹ Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:165-90.
- ¹⁰⁰ Pestka S, Krause CD, Sarkar D et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:929-79.
- ¹⁰¹ Mege JL, Meghari S, Honstettre A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis*. 2006 Sep;6(9):557-69.
- ¹⁰² O'Garra A, Trinchieri G. Are dendritic cells afraid of commitment? *Nat Immunol*. 2004 Dec;5(12):1206-8
- ¹⁰³ Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*. 2004 Dec;202:8-32.
- ¹⁰⁴ Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90
- ¹⁰⁵ Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* 2002; 277 (33):29355-8.
- ¹⁰⁶ O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004a; 10 (8):801-5.
- ¹⁰⁷ O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007; 7 (6):425-8.
- ¹⁰⁸ Hidaka H, Nairn AC, Krebs EG, Cohen P, Yamakawa T, Takaku F, και συν. (1996). *Intracellular Signal Transduction*. USA: Academic Press INC.
- ¹⁰⁹ Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 2004; 28 (3):109-23.
- ¹¹⁰ Cannon JG. Inflammatory cytokines in nonpathological states. *News Physiol Sci* 2000, 15:298-303
- ¹¹¹ Weissenbach J., Chernajovsky Y., Zeevi M. et al. Two interferon mRNA in humans fibroblasts. In vitro translation and escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7.152-7.156.

-
- ¹¹² Poupart P., Vandenabeele P., Cayphas S. et al. B cell growth modulation and differentiating activity of recombinant human 26-kD protein (BSF-2, HuIFN-B2, HPFG). *EMBO J* 1987; 6:1219-1224.
- ¹¹³ Hirano T., Taga T., Yamasaki K. et al. Molecule cloning of the cDNAs for interleukin-6/B cell stimulatory factor 2 and its receptor. *Ann NY Acad Sci* 1989;557:167-180.
- ¹¹⁴ Jambou RC, Snouwaert JN, Bishop GA, et al. High-level expression of a bioengineered cystein-free hepatocyte factor(interleukin-6)-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 9426-9430.
- ¹¹⁵ Hirano T & Kishimoto T. Handbook of experimental pharmacology peptide growth factors and their receptors (ed Sporn MB & Roberts AB), Berlin 1990, vol 95/I, pp: 633-665.
- ¹¹⁶ William J Marshall. Clinical Biochemistry. Metabolic and Clinical Aspects. Cellular Aspects Of Clinical Biochemistry ed.1995;chapter 40 pp:720-726.
- ¹¹⁷ Rothwell NJ. The endocrine significance of cytokines. *G Endocrinology* 1991; 128 : 171-173.
- ¹¹⁸ Sironi M, Breviario F, Proserpio P et al. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol* 1989; 142: 549-553.
- ¹¹⁹ Hirata Y, Taga T, Hibi M et al. Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol* 1989; 143:2900-2906.
- ¹²⁰ Bauer J, Bauer TM, Kalb T et al. Regulation of IL-6 receptor expression in human monocytes and monocyte -derived macrophages . *J Exp Med* 1989; 170: 1537-1549.
- ¹²¹ Novak's Γυναικολογία I , 12η έκδοση(1998). Γνώσεις από τις Βασικές Επιστήμες. κεφ.6 : Μοριακή Βιολογία και Γενετική σελ.190-207.
- ¹²² Gehr G., Braun T. and Lesslauer W. Cytokines, receptors and inhibitors. *Clin. Invest.* 1992; 70:64-69.
- ¹²³ Content J, De Wit L, Poupart P et al .Induction of a26 –kDa –protein mRNA in human cells treated with an interleukin -1 –related, leukocyte-derived factor. *Eur J Biochem* 1985;152: 253-257.
- ¹²⁴ Kasid A, Director ER, Rosenberg SA .Induction of endogenous cytokine mRNA in circulating peripheral blood mononuclear cells by IL-2 administration to cancer patients. *J Immunol* 1989;143:736-739.
- ¹²⁵ Katz Y& Strunk RC .IL-1 and TNF similarities and differences in stimulation of alternative pathway of complement and IFN-β2/IL-6 genes in human fibroblasts. *J Immunol* 1989;142: 3862-3867.
- ¹²⁶ Van Damme J, Cayphas S, Opdenkker G et al. Interleukin 1 and poly(rl)poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts. *Eur J Immunol* 1987; 17:1-7..
- ¹²⁷ Franchimont N, Durant D, Rydzziel S, Canalis E. Platelet-derived growth factor induces interleukin-6 transcription in osteoblasts through the activator protein-1 complex and activating transcription factor-2. *J Biol Chem* 1999Mar5;274(10):6783-9.

-
- ¹²⁸ Coulie PG, Cayphas S, Vink A et al. Interleukin –HP1- related hybridoma and plasmacytoma growth factors induced by lipopolysaccharide in vivo. *Eur J Immunol* 1987;17: 1217-1220.
- ¹²⁹ Van Damme J, Schafsma MR, Fibbe WE et al. Simultaneous production of Interleukin 6, interferon – β and colony stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. *Eur J Immunol* 1989; 19:163-168.
- ¹³⁰ Sengal PB, Helfgott DC, Santhanam U et al. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2 –interferon / hepatocyte – stimulating factor / interleukin 6 gene in virus- infected human fibroblasts. *J Exp Med* 1988;167:1951-1956.
- ¹³¹ Nakajima K, Martinez –Maza O, Hirano T et al. Induction of interleukin 6 (BSF-2/IFN- β 2) production by human immunodeficiency virus (HIV). *J Immunol* 1989; 142: 531-536.
- ¹³² May LT, Ohrayeb J, Santhanam U et al. Synthesis and excretion of multiple forms of beta 2 interferon /B-cell differentiation factor 2/ hepatocyte – stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem* 1988; 263: 7760-7766.
- ¹³³ Dudley D.G., Mitchell M.D. and Lundin-Schiller S. Human chorion leave cells produce copious amounts of interleukin-6 after stimulation with other inflammatory cytokines and endotoxin. 38th Annual Meeting of the Society for the Gynecologic Investigation 1991. Abstract 99.
- ¹³⁴ Woloski BMRNJ, Smith EM, Meyer WJIII et al. Corticotrophine –releasing activity of monokines. *Science* 1985; 230:1035-1037.
- ¹³⁵ Andus T, Geiger T, Hirano T et al. Recombinant human B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2 /IFN β 2) regulates b-fibrogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett* 1987 ; 221:18-22.
- ¹³⁶ Schindler R, Mancilla J, Endres S, et al. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and TNF in human mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75:40-47.
- ¹³⁷ Salas MA, Evans SW, Levell MG, Whicher JT. Interleukin-6 and ACTH act synergistically to stimulate the release of corticosterone from adrenal gland cells. *Clin Exp Immunol* 1990; 79:470-473.
- ¹³⁸ Spangelo BL, Isakson PC, Macleod RM. Production of interleukin-6 by pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3'5'- monophosphate and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 1990; 127:403-409.
- ¹³⁹ Spangelo BL, Jubb AM, Isakson PC, Macleod RM. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 1989; 125:575-577.
- ¹⁴⁰ Sehgal PB, Greininger G, Tosato G (Editors). Regulation of the acute phase and immune responses. Interleukin-6. *Ann NY Acad Sci* 1989; 557:1-583.
- ¹⁴¹ Takahara H, Mori A, Tabata R, et al. Left atrial myxoma with production of interleukin 6. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1992; 40:326-329.

-
- ¹⁴² Hirano T., Matsuda T., Turner M, et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1988; 18:1797-1801.
- ¹⁴³ Gordon C, Richards N, Howie AJ, et al. Urinary IL-6: a marker for mesangial proliferative glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 1991; 86:145-149.
- ¹⁴⁴ Breen EC, Rezai AR, Nakajima K, et al. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels production. *J Immunol* 1990; 144: 480-484.
- ¹⁴⁵ Kakumu S, Fukatsu A, Shinagawa T, et al. Localisation of intrahepatic interleukin 6 in patients with acute and chronic liver disease. *J Clin Pathol* 1992; 45:408-411.
- ¹⁴⁶ Akira S, Hirano T, Taga T, et al. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* 1990; 4: 2860-2867.
- ¹⁴⁷ Yee C, Biondi A, Wang XH, et al. A possible autocrine role for interleukin-6 in two lymphomas cell lines. *Blood* 1990; 74:798-804.
- ¹⁴⁸ Blay JY, Negrier S, Combaret V, et al. Analysis of changes in serum levels of TNF, IL-1 and IL-6 during administration of the IL-2 correlation with clinical response to treatment. *Bull Cancer (Paris)* 1992; 79: 55-65.
- ¹⁴⁹ Dietrich Conze, Linda Weiss, Patricia Susan Regan, et al. Autocrine Production of Interleukin 6 Causes Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 2001Dec; 61:8851-8858.
- ¹⁵⁰ M. J. Reed and A. Purohit. Breast Cancer and the Role of Cytokines in Regulating Estrogen Synthesis: An Emerging Hypothesis. *Endocrine Reviews* 1997; 18(5):701-715.
- ¹⁵¹ Glezerman M, Mazot M, Maymon E, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 are differently expressed by fresh human cancerous ovarian tissue and primary cell lines. *Eur Cytokine Netw.* 1998Jun; 9(2): 171-179.
- ¹⁵² Shenkin A, Fraser WD, Series J et al. The serum interleukin 6 responses to elective surgery. *Lymphotoxine Res* 1989; 8:123-127.
- ¹⁵³ Helle M, Brakenhoff JPI, De Groot ER et al. Interleukin 6 is involved in interleukin 1 induced activities. *Eur J Immunol* 1988;18: 957-959.
- ¹⁵⁴ Van Gool J, Van Vugt H, Helle M et al. The relation among stress adrenaline, interleukin 6 and acute phase proteins in the rat. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 57: 200-210.
- ¹⁵⁵ Aderka D, Le J, Vilcek J. Interleukin-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells and in mice. *J Immunol* 1989;143: 3517-3523.
- ¹⁵⁶ Pannica D, Nedwin GE, Hayflick JS et al. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984; 312:724-729.
- ¹⁵⁷ Carswell EA, Old LJ, Kassel RL et al. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666-3670.
- ¹⁵⁸ Smith RA & Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 1987; 262:6951-6954.

-
- ¹⁵⁹ Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 6361-6373.
- ¹⁶⁰ Mannel DN, Moore RN, Margenhager SE. Macrophages as a major source of tumoricidal activity (tumor necrotizing factor). *Infect Immunol* 1980; 30:523-528.
- ¹⁶¹ Cuturi MC, Murphy M, Costa-Giomi MP et al. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165:1581-1594.
- ¹⁶² Backer JC, Kolanus W, Lonnemann C et al. Human natural killer clones enhance in vivo antibody production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Scand J Immunol* 1990; 31:153-162.
- ¹⁶³ Dubravec DB, Springgs DR, Mannick JA et al. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor- α . *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6758-6761.
- ¹⁶⁴ Γερμενής Α, Ιατρική ανοσολογία 2000: σελ 125-139.
- ¹⁶⁵ Aggarwal B, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by human interferon. *Nature* 1985; 318:665-667.
- ¹⁶⁶ Beutler B & Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:505-518.
- ¹⁶⁷ Perlmutter DH, Dinarello CA, Punsal PI et al. Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute phase gene expression. *J Clin Invest* 1986; 78:1349-1353.
- ¹⁶⁸ Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J Exp Med* 1986; 163:1433-1450.
- ¹⁶⁹ Yoneda T, Alsima MA, Chavez JB et al. Evidence that tumor necrosis factor plays a pathogenetic role in the paraneoplastic syndromes of cachexia, hypercalcemia and leukokytosis in a human tumor in nude mice. *J Clin Invest* 1991; 87:977-985.
- ¹⁷⁰ Balkwill F, Osborne R, Burke F et al. Evidence for tumor necrosis factor/cachectin production in cancer. *Lancet* 1987; ii: 1229-1232.
- ¹⁷¹ Natarajan R, Ploszaj S, Horton R, Nadler J. Tumor necrosis factor and interleukin-1 are potent inhibitors of angiotensin II induced aldosterone synthesis. *Endocrinology* 1989; 125:3084-3089.
- ¹⁷² Gee MH, Tahamont MV, Perkowski SZ, Flynn JT. Arachidonic acid metabolites as mediators of lung injury during intravascular complement activation. *Prog Biochem Pharmacol* 1985; 20:108-119.
- ¹⁷³ Philip R, Epstein LB. Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon and interleukin 1. *Nature (London)* 1986; 323:86-89.

-
- ¹⁷⁴ Conti P, Dempsey RA, Reale M et al. Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 α , β , tumor necrosis factor and interleukin-6. *Immunol* 1991; 73:450-456.
- ¹⁷⁵ Mestan J, Didel W, Mitnacht S et al. Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor in vivo. *Nature* 1986; 323:816-818.
- ¹⁷⁶ Djeu JY, Blanchard DK, Richards AL et al. Tumor necrosis factor induction by candida albicans from human natural killer cells and monocytes. *J Immunol* 1988; 141:4047-4052.
- ¹⁷⁷ Jaattela M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- α /cachectin. *Lab Invest* 1991; 64:724-742.
- ¹⁷⁸ Waage A, Bakke O. Glucocorticoids suppress the production of tumor necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Immunology* 1988; 63:299-302.
- ¹⁷⁹ Kunkel SL, Spengler M, May MA et al. Prostaglandin E₂ regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem* 1989; 263:5380-5384.
- ¹⁸⁰ Zabel P, Walter DT, Schonharting MM et al. Oxpentifyllin in endotoxemia. *Lancet* 1989; 2:1474-1477.
- ¹⁸¹ Remick DG, Nguyen DT, Askandari MK et al. Cyclosporine A inhibits TNF production without decreasing TNF mRNA levels. *Biochem Biosyn Res Commun* 1989; 161:551-555.
- ¹⁸² Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG et al. Anticachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 1987; 330:662-664.
- ¹⁸³ Millar AB, Foley NM, Singer M et al. Tumor necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1989; ii: 712-715.
- ¹⁸⁴ Poli G, Kinter A, Justement JS et al. Tumor necrosis factor α functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:782-785.
- ¹⁸⁵ Raub W. Tumor necrosis factor levels increased in cardiac cachexia. *JAMA* 1990; 264:2191.
- ¹⁸⁶ Berral-Netto M, Badaro R, Barral A et al. Tumor necrosis factor (cachectin) in humans visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1991; 163: 853-857.
- ¹⁸⁷ Jones A, Selby PJ, Viner C et al. Tumor necrosis factor, cholestatic jaundice, and chronic liver disease. *Gut* 1990; 31: 938-939.
- ¹⁸⁸ Arend WP & Dayer J-M. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1990; 33:305-315.
- ¹⁸⁹ Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gyn & Obst* 1988; 166:147-153.
- ¹⁹⁰ Maury CPJ, Terro A-M. Raised serum levels of cachectin/TNF α in renal allograft rejection. *J Exp Med* 1987; 166:1132-1137.

-
- ¹⁹¹ Isaaks A, Lindenmann J. Virus Interference I. The interferon Proc. R. Soc. Lond. (Biol) 147-238, 1957.
- ¹⁹² Stewart WW: The interferon system New York. Springer pp 421, 1979.
- ¹⁹³ Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD and Smyth JF. Radioimmunoassay detection of IFN- γ in urine after intravesical Evans BCG therapy. The Journal of Urology, voi 144, 1248-1251, June 1990..
- ¹⁹⁴ Canes C. Sent and Peter Lengyel: The interferon system. The Journal of Biological Chemistry, voi 267, No 8, pp 5017-5020, 1992.
- ¹⁹⁵ Legroux, L. and N. Arbour, Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. J Neuroimmune Pharmacol, 2015. 10 (4): p. 528-46.
- ¹⁹⁶ Chitnis, T., The role of CD4 T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. Int Rev Neurobiol, 2007. 79: p. 43-72.
- ¹⁹⁷ Mittrucker, H.W., A. Visekruna, and M. Huber, Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014. 62(6): p. 449-58.
- ¹⁹⁸ Lowther, D.E. and D.A. Hafler, Regulatory T cells in the central nervous system. Immunol Rev, 2012. 248(1): p. 156-69.
- ¹⁹⁹ Kleinewietfeld, M. and D.A. Hafler, Regulatory Tcells in autoimmune neuroinflammation. Immunol Rev, 2014. 259(1): p. 231-44.
- ²⁰⁰ Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells. Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 1989;7:145-73.
- ²⁰¹ Romagnani S. Biology of human Th1 and Th2 cells. Clin Immunol. 1995;15:121-9.
- ²⁰² Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei X-F, Achong MK. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. J Clin Invest 1998 Jan;101(2):311-20 .
- ²⁰³ Fattori E, Cappelletti M, Costa P, et al. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. J Exp Med 1994;180:1243-50 77.
- ²⁰⁴ Zeilder C, Kanz L, Hurkuck KL, et al. In vivo effects of interleukin 6 on thrombopoiesis in healthy and irradiated primates. Blood 1992;80:2740-5.
- ²⁰⁵ Kelso A. Th1 and Th2 subsets:paradigms lost? Immunol.Today 1995;16:374-9.
- ²⁰⁶ Abbas AK, Murphy KM, Sher A.Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 1996;383:787-93.
- ²⁰⁷ Roit, Brostof, Male. (Immunology 2001) Ανοσολογία, έκτη έκδοση. Σελ.28,126-7.
- ²⁰⁸ Shultz LD1, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. J Immunol. 1995 Jan 1;154(1):180-91.

-
- ²⁰⁹ Armstrong PJ, Johanning JM, Calton WC Jr, Delatore JR, Franklin DP, Han DC, Carey DJ, Elmore JR. Differential gene expression in human abdominal aorta: aneurysmal versus occlusive disease. *J Vasc Surg.* 2002; 35: 346-355.
- ²¹⁰ Tarlov IM. Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs, *AMA Arch Neurol Psychiatry* 5 (1954) 588–597.
- ²¹¹ Westvik, TS., Fitzgerald, TN., Muto, A., Maloney, S.P., Pimiento, J.M., Fancher, T., Magri, D., Westvik, H., Nishibe, T., Velazquez, O.C., Dardik A. Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis, *Journal of Vascular Surgery* 49 (2009) 464–473.
- ²¹² Perez F, Palmite R. Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism, *PNAS* 102 (2004) 2174-2179.
- ²¹³ Zhernosekov, KP, Filosofov, D.V., Baum, R.P., Aschoff, P., Bihl, H., Razbash, AA., Jahn, M., Jennewein, M., Rösch, F. Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application, *Journal of Nuclear Medicine* 48 (2007) 1741-1748.
- ²¹⁴ Gourni E, Bouziotis P, Benaki D, Loudos G, Xanthopoulos S, Paravatou-Petsotas M, Mavri-Vavagianni M, Pelecanou M, Archimandritis S.C, Varvarigou A.D. Structural Assessment and Biological Evaluation of Two N3S Bombesin Derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (2009) 4234–4246.
- ²¹⁵ Harrington SC, Simari RD, Conover CA. Genetic deletion of pregnancy-associated plasma protein-A is associated with resistance to atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice challenged with a high-fat diet. *Circ Res.* 2007; 100: 1696-1702.
- ²¹⁶ Springer TA. Monoclonal antibody analysis of complex biological systems. Combination of cell hybridization and immunoabsorbents in a novel cascade procedure and its application to the macrophage cell surface. *J Biol Chem.* 1981; 256: 3833-3839.
- ²¹⁷ Walker EB, Akporiaye ET, Warner NL, Stewart CC. Characterization of subsets of bone marrow-derived macrophages by flow cytometry analysis. *J Leukoc Biol.* 1985; 37: 121-136.
- ²¹⁸ Flotte TJ, Springer TA, Thorbecke GJ. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am J Pathol.* 1983; 111: 112-124.
- ²¹⁹ Akdemir, O., Hede, Y., Zhang, F., Lineaweaver, W.C., Arslan, I., Songur, E. Effects of taurine on reperfusion injury, *J Plast Reconstr Aesthet Surgery* 64 (2011) 921-928.
- ²²⁰ Williams, A., Steffens, F., Reinecke, C., Meyer, D. The Th1/Th2/Th17 cytokine profile of HIV-infected individuals: A multivariate cytokinomics approach, *Cytokine.* (2013) 521 - 526.
- ²²¹ Biscetti, F., Giovanni, P., Giuseppe, S., Vincenzo, A., Egidio, S., Sergio, R., Franco, L., Flavia, A., Giovanni, G., Andrea, F. Cilostazol promotes angiogenesis after peripheral ischemia through a VEGF-dependent mechanism, *International Journal of Cardiology* 167 (2012) 910-916.
- ²²² Arras, M., Ito W.D., Scholz, D., Winkler, B., Schaper, J., Schaper. W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb, *J Clin Invest* 101 (1998) 40–50.

-
- ²²³ Couffinhal, T., Silver, M., Kearney, M., Sullivan, A., Witzenbichler, B.,; Magner, M., Annex, B., Peters, K., Isner J.M. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice, *Circulation* 99 (1999) 3188–3198.
- ²²⁴ Dawson, D.L., Cutler, B.S., Hiatt, W.R., Hobson, R.W., Martin, J.D., Bortey, E.B., Forbes, W.P., Strandness E., A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication, *Am. J Med.* 109 (2000) 523–530.
- ²²⁵ Liu, Y., Fong, M., Cone, J., Wang, S., Yoshitake, M., Kambayashi, J., Inhibition of adenosine uptake and augmentation of ischemia-induced increase of interstitial adenosine by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication. *J. Cardiovascular Pharmacology* 36 (2000) 351–360,
- ²²⁶ Sun, F., Yin, Z., Yu, H., Quan-Xing, S., Bei, Z., Li-Guo, Z., Shou-Li, W. Cilostazol inhibits plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation, *Journal of Geriatric Cardiology* 12 (2015) 388–393.
- ²²⁷ Netherton SJ, Maurice DH Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis, *Mol Pharmacology* 67 (2005) 263 - 272.
- ²²⁸ Otsuki, M., Saito, H., Xu, X., Sumitani, S., Kouhara, H., Kurabayashi, M., Kasayama, S. Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF- κ B binding to its recognition sequence, *Atherosclerosis* 158 (2001) 121–128.
- ²²⁹ Park, S.Y., Lee, S.W., Lee, W.S., Rhim, B.Y., Lee, S.J., Kwon, S.M., Hong, K.W., Kim, C.D. RhoA/ROCK-dependent pathway is required for TLR2-mediated IL-23 production in human synovial macrophages: suppression by cilostazol, *Biochem Pharmacol* 86 (2013) 1320–1327.
- ²³⁰ Platzer, C., Döcke, W., Volk, H.D., Prösch, S. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells, *Journal of Neuroimmunology* 105 (1999) 31–38..
- ²³¹ Williams, A., Steffens, F., Reinecke, C., Meyer, D. The Th1/Th2/Th17 cytokine profile of HIV-infected individuals: A multivariate cytokinomics approach, *Cytokine*. (2013) 521 - 526.
- ²³² Horton, M.A. The α v β 3 integrin “vitronectin receptor”, *Int J Biochem Cell Biology* 29 (1997) 721–725.
- ²³³ Cai, W., Gambhir, S., Chen, X. Multimodality tumor imaging targeting integrin α v β 3, *BioTechniques*. 39 (2005) S14–S25.
- ²³⁴ Bi, J., Yi, L. Effects of Integrins and Integrin α v β 3 Inhibitor on Angiogenesis in Cerebral Ischemic Stroke, *J Huazhong Univ Sci Technol*. 34 (2014) 299–305.
- ²³⁵ Goto T, Fukuyama N, Aki A. Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse. *Tokai J Exp Clin Medicine* 31 (2006) 128–132.

-
- ²³⁶ Marques SM, Campos PP, Castro PR, Cardoso CC, Ferreira MA, Andrade SP. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc Res.* 9 13, 2011, p. 246e52.
- ²³⁷ Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, et al. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 07 09, 2002, p. 775e87.
- ²³⁸ Wang S, Yan C, Xu H, et al. Suppression of encephalitogenic T-cell responses by cilostazol is associated with upregulation of regulatory T cells. 2010, *Neuroreport*, pp. 629–635.
- ²³⁹ Gupta SK, Mi D, Dubé MP, Saha CK, Johnson RM, Stein JH, Clauss MA, Mather KJ, Desta Z, Liu Z. Pentoxifylline, Inflammation, and Endothelial Function in HIV-Infected Persons: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *PLoS One.* 04 09, 2013..
- ²⁴⁰ Stabile E, Burnett M., Watkins G., Kinnaird T., Bachis A., La Sala A., Miller J., Shou M., Epstein S., Fuchs S. Impaired Arteriogenic Response to Acute Hindlimb Ischemia in CD4-Knockout Mice, *Circulation* 108 (2003) 205-210.
- ²⁴¹ Stabile E., T. Kinnaird, A. la Sala, S.K. Hanson, C. Watkins, U. Campia, M. Shou, S. Zbinden, S. Fuchs, H. Kornfeld, CD8⁺ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4⁺ mononuclear cells through the expression of interleukin-16, *Circulation* 113 (1) (2006) 118-124.
- ²⁴² Wang, S., Yan, C., Xu, H., Zhao, X., Han, Y. Suppression of encephalitogenic T-cell responses by cilostazol is associated with upregulation of regulatory T cells, *Neuroreport* 21 (2010) 629–635.
- ²⁴³ Kwee BJ, Budina E, Najibi AJ, Mooney DJ. CD4 T-cells regulate angiogenesis and myogenesis. *Biomaterials.* 178 (2018) 109-121.
- ²⁴⁴ Kammertoens T, Friese C, Arina A, Idel C, Briesemeister D, Rothe M, Ivanov A, Szymborska A, Patone G, Kunz S, Sommermeyer D, Engels B, Leisegang M, Textor A, Fehling HJ, Fruttiger M, Lohoff M, Herrmann A, Yu H, Weichselbaum R, Uckert W, Hübner N, Gerhardt H, Beule D, Schreiber H, Blankenstein T. Tumour ischaemia by interferon- γ resembles physiological blood vessel regression. *Nature.* 545 (2017) 98-102.
- ²⁴⁵ Spiller KL, Nassiri S, Witherel CE, Anfang RR, Ng J, Nakazawa KR, Yu T, Vunjak-Novakovic G. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials* 37 (2015) 194-207.
- ²⁴⁶ Takeda Y, Costa S, Delamarre E, Roncal C, Leite de Oliveira R, Squadrito ML, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Bruyère F, Wenes M, Hamm A, Serneels J, Magat J, Bhattacharyya T, Anisimov A, Jordan BF, Alitalo K, Maxwell P, Gallez B, Zhuang ZW, Saito Y, Simons M, De Palma M, Mazzone M. Macrophage skewing by Phd2 haplodeficiency prevents ischaemia by inducing arteriogenesis. *Nature* 479 (2011) 122-6.
- ²⁴⁷ Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, Ng J, Nakazawa KR, Daulton JW, Vunjak-Novakovic G. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials* 35 (2014) 4477-88.

²⁴⁸ Schaper, W. Collateral circulation: past and present, Basic Res Cardiology 1 (2009) 5-21.