

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Μελέτη του μηχανισμού δράσης στατινών στη
σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών σε
ασθενείς μετά από καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ**

ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΑΔΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαχαίρας Παναγιώτης, Καθηγητής
Κυρούδη Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Ανδρεάδου Ιωάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιτροπή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ.Μαρκαντώνη-Κυρούδη Σοφία, Καθηγητή κ.Μαχαίρα Παναγιώτη και Επίκουρο Καθηγητή κ.Δρακούλη Νικόλαο, του Τμήματος Φαρμακευτικής, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να συμμετέχω στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης «Κλινική Φαρμακευτική», όπου αγάπησα ακόμη περισσότερο την επιστήμη της Φαρμακευτικής και ανακάλυψα νέες πτυχές της επιστήμης μας την οποία και θα υπηρετήσω με αφοσίωση και συνέπεια στο μέλλον.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής κ.Ανδρεάδου Ιωάννα, η οποία μου εμπιστεύτηκε την παρούσα διπλωματική εργασία. Καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής, η καθοδήγησή της πάντα με υπομονή και επιμονή στάθηκε καθοριστική, και η σχέση που αναπτύχθηκε μεταξύ μας τόσο σε επαγγελματικό όσο και σε φιλικό επίπεδο, συνετέλεσε σημαντικά στην επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας.

Επίσης, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια της 1^{ης} Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου της Ιατρικής Σχολής κ.Σιγάλα Φραγκίσκα για την πολύτιμη συνεισφορά της καθώς για και την πρακτική βοήθεια που μου παρείχε στη συλλογή των δειγμάτων.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη του εργαστηρίου μας, κ.Τρις-Σοφία Μπίμπλη για τη βοήθεια και τη συνεχή παρουσία της στη διάρκεια των εργαστηριακών ωρών όλο αυτό το διάστημα και τον κ.Ευαγγέλου Κώστα που συνέβαλλε στην αξιολόγηση και στη λήψη φωτογραφιών της ανοσοϊστοχημείας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για την υποστήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόηση που επέδειξαν τα δυο τελευταία χρόνια.

Δήμητρα Καραγεωργιάδη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η αθηροσκλήρωση είναι η αιτία πολλών καρδιαγγειακών συμβαμάτων όπως του εγκεφαλικού επεισοδίου, του εμφράγματος του μυοκαρδίου και της περιφερικής αρτηριακής νόσου. Η αθηρογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και θεωρείται αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής η οποία εξελίσσεται και διαιωνίζεται λόγω δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου. Παράγοντες κινδύνου όπως η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση, ο διαβήτης και το κάπνισμα, μπορούν να επηρεάσουν τη φυσιολογική λειτουργία του ενδοθηλίου. Η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας και της λειτουργίας του NO είναι η κύρια επίπτωση και ευθύνεται για ένα μεγάλο μέρος της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Τα ενεργά ενδιάμεσα οξυγόνου συμμετέχουν και αυτά στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Οι ασταθείς αθηρωματικές πλάκες είναι υπεύθυνες για τα οξέα θανατηφόρα σύνδρομα. Οι αναστολείς του ενζύμου HMG-CoA αναγωγάσης, οι οποίοι χρησιμοποιούνται κατά κόρον τα τελευταία χρόνια για τη μείωση των επιπέδων των λιπιδίων, φαίνεται ότι έχουν επιπλέον ευεργετικές δράσεις ανεξάρτητες της υπολιπιδαιμικής τους δράσης.

Σκοπός: Στόχος της μελέτης αυτής είναι να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης των στατινών στη σταθεροποίηση των καρωτιδικών πλακών.

Μέθοδοι: Μελετήσαμε 29 τυχαία δείγματα αθηρωματικών πλακών από ασθενείς οι οποίοι είχαν υποστεί ενδαρτηρεκτομή. Τα ληφθέντα δείγματα χωρίστηκαν σε δυο ομάδες. Η πρώτη ομάδα παρασκευάστηκε με παραφίνη και ακολουθήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την έκφραση της eNOS. Τα δείγματα της δεύτερης ομάδας ομογενοποιήθηκαν με ειδικές μεθόδους και προσδιορίστηκαν οι πρωτεΐνες p-eNOS και p-Akt και οι ολικές μορφές τους με Western Blot καθώς και τα επίπεδα μηλονικής διαλδεύδης. Οι πρωτεΐνες eNOS και Akt σχετίζονται με το μονοπάτι PI3/Akt το οποίο οδηγεί στην παραγωγή του NO ενώ η μηλονική διαλδεύδη είναι δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Αποτελέσματα: Από τις μετρήσεις του Western Blot παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ενεργοποίηση της eNOS και της Akt στους ασθενείς που λάμβαναν στατίνη. Επίσης υπήρχε μεγαλύτερη ενεργοποίηση της Akt στους ασθενείς οι οποίοι είχαν σταθερές αθηρωματικές πλάκες. Η ανοσοϊστοχημεία έδειξε μειωμένη έκφραση της eNOS στις ασταθείς πλάκες σε σχέση με τις σταθερές όπου υπήρχε μέτρια έκφραση eNOS. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις μετρήσεις μηλονικής διαλδεύδης.

Συμπεράσματα: Η Akt φαίνεται ότι σχετίζεται περισσότερο με τη σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών σε σχέση με την eNOS. Η σταθεροποίηση των πλακών μπορεί να μην οφείλεται στη φωσφορυλίωση της eNOS και την παραγωγή NO, αλλά στην δράση της Akt μέσω άλλου μονοπατιού. Επιπλέον τα επίπεδα μηλονικής διαλδεύδης πιθανόν αφορούν τα πρώιμα στάδια της αθηρογένεσης και όχι τα προχωρημένα στάδια που σχετίζονται με τη ρήξη της πλάκας.

ABSTRACT

Introduction: Atherosclerosis is the key factor of various cardiovascular events such as stroke, myocardial infarction and peripheral arterial disease. Atherogenesis is a complicated process and claims to be the result of chronic inflammation, which develops and persists due to endothelial dysfunction. Risk factors such as dyslipidemia, hypertension, diabetes and smoking, can affect the normal function of the endothelium. The reduction of NO bioavailability and function is a major effect and is responsible for a big part of endothelial dysfunction. The reactive oxygen species are also involved in the development of atheromateous plaques. The unstable atheromateous plaques are responsible for acute fatal syndromes. The HMG-CoA inhibitors, which are predominantly used the past years for the reduction of lipid levels, appear to have additional beneficial effects independent of lipid-lowering mechanisms.

Aim: The aim of our study is to investigate the mechanism of action of statins in the stabilization of atheromateous plaques.

Methods: We studied 29 random samples of atherosclerotic plaques from patients who had undergone carotid endarterectomy. The obtained samples were cut into two groups. The samples of the first group were embedded in paraffin followed by immunohistochemistry for eNOS expression. The samples of the second group were homogenized and stored for further analysis of MDA and peNOS, pAkt and their total forms with Western Blot analysis. The eNOS and Akt proteins are related to the PI3/Akt pathway which leads to NO production, while MDA is an indicator of lipid peroxidation.

Results: From the Western Blot analysis we observed greater activation of eNOS and Akt in patients undergoing statin therapy. In addition there was an increased activation of Akt in patients who had stable atherosclerotic plaques. Immunohistochemistry showed weak expression of eNOS in unstable plaques compared to the moderate expression of eNOS in stable plaques. There was no statistical importance in the MDA measurements.

Conclusions: Akt seems to be more involved in the stabilization of atherosclerotic plaques compared to eNOS. Plaque stabilization may not be the result of eNOS phosphorylation and NO production, but the effect of Akt through another pathway. Furthermore MDA levels may contribute mainly at early stages of atherosclerosis and are not associated with latter stages related to plaque vulnerability and disruption.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Αθηρωμάτωση	12
2. Παράγοντες κινδύνου	13
2.1 Υπερλιπιδαιμία	15
3. Επιπτώσεις	17
4. Κλινικές εκδηλώσεις	18
5. Κλινικά ευρήματα	19
5.1 Συμπτώματα	19
5.2 Σημεία	20
5.3 Μη επεμβατικές δοκιμασίες	21
5.4 Μελέτες απεικόνισης	21
6. Θεραπεία και πρόγνωση	22
7. Παθοφυσιολογία	24
7.1 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία	24
7.2 Αθηρωματική πλάκα	26
7.2.1 Δημιουργία αθηρωματικής πλάκας	26
7.2.2 Τύποι αθηρωματικών πλακών	29
7.2.3 Σταθερή vs ασταθής πλάκα	31
8. Οξειδωτικό στρες	35
8.1 Ορισμοί	35
8.2 Γενικές βλάβες από ROS	36
8.3 Ο ρόλος των ROS στην αθηροσκλήρωση	37
8.3.1 Οξείδωση της LDL	38
8.3.2 Μονοξείδιο του αζώτου (NO)	40
8.3.2.1 Συνθετάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS)	40
8.3.2.2 Ισομορφές των NOS και φυσιολογικές λειτουργίες	42
8.3.2.3 Ενεργά ενδιάμεσα αζώτου (RNS)	44
8.4 Αντιοξειδωτικά και αγγειακά νοσήματα	46
9. Στατίνες	49

9.1. Αναστολείς της HMG-CoA αναγωγής	49
9.2. Δομή στατινών	50
9.3. Μηχανισμός δράσης	52
9.3.1 Εξαρτώμενος από τα λιπίδια μηχανισμός (lipid-dependent)	52
9.3.2 Ανεξάρτητος από τα λιπίδια μηχανισμός (lipid-independent)	53
9.3.2.1 Μονοπάτι PI3K/Akt	55
9.4. Κλινικές μελέτες	56

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης	59
2. Υλικά και μεθοδολογία	59
2.1 Εγγραφή και συγκατάθεση ασθενών	59
2.2 Πρωτόκολλο μελέτης	60
2.3 Παθολογοανατομική παρατήρηση	63
3. Αναλυτικές μέθοδοι	64
3.1 Western Blot	64
3.2 Ανοσοϊστοχημεία	71
3.3 Μέτρηση μηλονικής διαλδεύδης	74
4. Στατιστική ανάλυση	76
5. Αποτελέσματα	77
6. Συζήτηση	97
7. Συμπεράσματα	100
8. Περιορισμοί της μελέτης	100
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	101

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σχήμα 2.1. Παράγοντες κινδύνου αθηρωματικής νόσου	15
Σχήμα 2.2. Φυσιολογικές και παθολογικές τιμές των LDL, HDL και ολικής χοληστερόλης	16
Σχήμα 2.3. Ειδικός τρόπος υπολογισμού του καρδιαγγειακού κινδύνου που διατρέχει ένας ασθενής	17
Σχήμα 4.1. Ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας σε απόφραξη της δεξιάς κοινής λαγονίου αρτηρίας και του διχασμού της αορτής	18
Σχήμα 5.1. Έγχρωμη υπερηχογραφία καρωτιδικής νόσου	21
Σχήμα 6.1. Αγγειογραφία αορτικού τόξου-αγγείων τραχήλου	23
Σχήμα 7.1. Απεικόνιση τοιχώματος αγγείου	24
Σχήμα 7.2. Κύριες βιολογικά δραστικές ουσίες που παράγονται από το αγγειακό ενδοθήλιο και ο ρυθμιστικός τους ρόλος	25
Σχήμα 7.3. Αναλυτικά τα κύρια στάδια δημιουργίας μιας αθηρωματικής πλάκας μέχρι τη ρήξη της	26
Σχήμα 7.4. Σχηματική απεικόνιση της εκλεκτικής προτίμησης της ανάπτυξης των αθηρωματικών πλακών στις εκφύσεις και στους διχασμούς των αρτηριών	27
Σχήμα 7.5. Μικροφωτογραφία βλάβης τύπου IV μετά από μεγέθυνση (x55)	27
Σχήμα 7.6. Η αύξηση της αθηρωματικής πλάκας σε πρώιμα στάδια	28
Σχήμα 7.7. Σχηματική παράσταση των διαφορετικών τύπων αθηρωματικών βλαβών σε εγκάρσιες τομές	29
Σχήμα 7.8. Τύποι αθηρωματικών πλακών	30
Σχήμα 7.9. Εγκάρσια τομή ασταθούς και σταθερής αθηρωματικής πλάκας	31
Σχήμα 7.10. Σχηματικά οι διαφορές ασταθούς και σταθερής αθηρωματικής πλάκας	32
Σχήμα 7.11. Απεικόνιση πιθανών παθοφυσιολογικών μηχανισμών αστάθειας της αθηρωματικής πλάκας, της ρήξης και της θρόμβωσης	33
Σχήμα 7.12. Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης	34
Σχήμα 8.1. Σχηματισμός ROS	35
Σχήμα 8.2. Οι αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss	36
Σχήμα 8.3. Λιπιδική υπεροξειδωση και τα προϊόντα της	37
Σχήμα 8.4. Δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου	38
Σχήμα 8.5. Σχηματικά απεικονίζονται οι δράσεις της ox-LDL	39

Σχήμα 8.6. Παραγωγή NO	40
Σχήμα 8.7. Βιολογικές επιδράσεις του NO	41
Σχήμα 8.8. Δομή μιας συνθετάσης που εκθέτει τις σχετικές θέσεις των προσθετικών ομάδων και συμπαραγόντων	42
Σχήμα 8.9. Σχηματική αναπαράσταση δράσης eNOS	43
Σχήμα 8.10. Μοριακοί μηχανισμοί του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος	44
Σχήμα 8.11. Γενικό σχήμα που απεικονίζει τις επιπτώσεις από το υπεροξυνιτρώδες ανιόν στο καρδιαγγειακό σύστημα	45
Σχήμα 8.12. Σχηματισμός των ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου και αζώτου	46
Σχήμα 8.13. Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης σε 28 βήματα.	47
Σχήμα 8.14. Συγκεντρωτικός πίνακας μελετών για τα αποτελέσματα μετά από τη λήψη βιταμίνης E	49
Σχήμα 9.1. Χημική δομή των στατινών και η καθοριστική αντίδραση που αναστέλλουν	50
Σχήμα 9.2. Ενεργοποίηση eNOS από στατίνες, μέσω δυο διαφορετικών οδών	53
Σχήμα 9.3. Μονοπάτι μετάδοσης σήματος που ρυθμίζει τη χοληστερόλη και την αναστολή ενεργοποίησης eNOS μέσω Rho κινασών	54
Σχήμα 9.4. Οι ορόσημες μελέτες οι οποίες εδραίωσαν το όφελος της θεραπείας με στατίνες σε καρδιαγγειακή νόσο	57

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σχήμα 2.1. Χειρουργικά παρασκευάσματα καρωτιδικών διχασμών	60
Σχήμα 2.2. Πίνακας δημογραφικών και κλινικών στοιχείων των ασθενών	62
Σχήμα 2.3. Τυπικές επιπλεγμένες πλάκες με έντονα στοιχεία εξελκώσεων ή και αιμορραγίας παρατηρούνται στις δυο αθηρωματικές πλάκες του καρωτιδικού διχασμού	63
Σχήμα 3.1. Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων	65
Σχήμα 3.2. Αποτελέσματα φωτομέτρησης	66
Σχήμα 3.3. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης	67
Σχήμα 3.4. Συσχέτιση μοριακού βάρους πρωτεΐνης με σύσταση running gel	68
Σχήμα 3.5. Ενδεικτικές μπάντες marker	68
Σχήμα 3.6. Παράδειγμα marker για ταυτοποίηση πρωτεϊνών	69

Σχήμα 3.7. Διαδικασία επώασεων	70
Σχήμα 3.8. Διαδικασία εμφάνισης	71
Σχήμα 3.9. Απεικόνιση πρόσδεσης αντισωμάτων στις πρωτεΐνες	72
Σχήμα 3.10. Απεικόνιση τελικού συμπλέγματος	73
Σχήμα 3.11. Η αντίδραση της MDA με το N-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδόλιο προς την παραγωγή χρωμοφόρου προϊόντος.	74
Σχήμα 3.12. Καμπύλη αναφοράς για τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης	75
Σχήμα 3.13. Καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της MDA	76
Σχήμα 4.1. Ραβδόγραμμα κατανομής ασθενών	77
Σχήμα 4.2. – 4.8. Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών για peNOS/teNOS και teNOS/b actin	78-81
Σχήμα 4.9. – 4.10. Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών για pAkt/tAkt και tAkt/b actin	82
Σχήμα 4.11. Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων peNOS/teNOS και teNOS/b actin ως προς τη λήψη ή όχι στατινών	83
Σχήμα 4.12. Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων peNOS/teNOS και teNOS/b actin ως προς τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας.	83
Σχήμα 4.13. Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων pAkt/tAkt και tAkt/b actin ως προς τη λήψη ή όχι στατινών	84
Σχήμα 4.14. Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων pAkt/tAkt και tAkt/b actin ως προς τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας.	84
Σχήμα 4.15. – 4.19. Εικόνες ανοσοϊστοχημείας	85-94
Σχήμα 4.20. Ιστόγραμμα που απεικονίζει πως κατανέμονται οι ιστοί ανάλογα με την έκφραση της eNOS και τη σταθερότητα της πλάκας.	95
Σχήμα 4.21. Ιστόγραμμα που απεικονίζει πως κατανέμονται οι ιστοί ανάλογα με την έκφραση της eNOS και της λήψης ή όχι στατινής.	95
Σχήμα 4.22. Επίπεδα MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$) σε ασθενείς που λάμβαναν στατίνη και σε ασθενείς που δεν λάμβαναν στατίνη	96
Σχήμα 4.23. Επίπεδα MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$) σε ασθενείς με ασταθή αθηρωματική πλάκα και σε ασθενείς με σταθερή αθηρωματική πλάκα	96

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Ορισμοί

Η αθηρωματική αγγειοπάθεια μπορεί να εκδηλωθεί με τη μορφή στεφανιαίας νόσου (π.χ. στηθάγχη, έμφραγμα του μυοκαρδίου, αιφνίδιος θάνατος), αγγειακής νόσου του εγκεφάλου (π.χ. αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και παροδική ισχαιμική προσβολή) ή περιφερικής αγγειοπάθειας (π.χ. χωλότητα και κρίσιμου βαθμού ισχαιμία κάτω άκρου). Αυτές οι οντότητες συχνά συνυπάρχουν και η παθογένεια είναι ίδια σε όλα τα προσβεβλημένα αγγεία.¹

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί την πρωταρχική αιτία θανάτου στις σύγχρονες Δυτικές κοινωνίες και οφείλεται στην πλειονότητα των περιπτώσεων, σε στενωτικές βλάβες των στεφανιαίων αρτηριών λόγω αθηρωματικών πλακών.² Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες η στεφανιαία νόσος ευθύνεται για το 1/3 των θανάτων παγκοσμίως και προσβάλλει πάνω από 17 εκατομμύρια άτομα ετησίως. Στις χώρες της ανατολικής Μεσογείου το ποσοστό των θανάτων από στεφανιαία νόσο κυμαίνεται από 25-45% (Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, 2005). Επιπλέον στατιστικά στοιχεία από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας κατά τα έτη 1995-1998 κατέδειξαν ότι 68.8 στους 100.000 Έλληνες έπασχαν από κάποια καρδιακή νόσο.³

Η αθηρωμάτωση είναι ένας όρος ο οποίος αναφέρεται στις αλλαγές που πραγματοποιούνται μέσα στα τοιχώματα των αγγείων και αφορούν κυρίως παθολογικές αλλοιώσεις του χιτώνα, με χαρακτηριστικά ευρήματα την πάχυνση του τοιχώματος, αυξημένο περιεχόμενο λιπιδίων και σχηματισμό πλακών.⁴ Σύμφωνα με κείμενα αρχαίων Ελλήνων ιατρών η ετυμολογία της λέξης «αθήρωμα» προέρχεται από την άθαρη, δηλαδή το χυλό χοντροκομμένου σιταριού, «το μεν αθήρωμα εστίν όγκος ομόχρους, ανώδυνος, εν χιτώνι νευρώδει περιέχων αργού υγρού συλλογήν, εοικότος τη λεγομένη αθήρη τη εξ αλεύρου εψουμένη σκευαζομένη».⁵

Αρτηριοσκλήρωση χαρακτηρίζεται η εκφυλιστική βλάβη που προσβάλλει κυρίως το μυϊκό χιτώνα των αρτηριών και συνήθως συνοδεύεται από εναπόθεση αλάτων ασβεστίου. Όλες αυτές οι βλάβες μπορούν να βρεθούν αυτούσιες, στις περισσότερες περιπτώσεις όμως συνυπάρχουν και αναφέρονται ως αθηροσκλήρωση.⁶

2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Σε κάθε νόσημα η ύπαρξη ενός και μόνο παράγοντα κινδύνου αντιστοιχεί σε αυξημένη πιθανότητα μελλοντικής εμφάνισης του νοσήματος, σε σχέση με άτομα που δεν έχουν τον παράγοντα αυτό.² Η ταυτοποίηση συγκεκριμένων παραγόντων κινδύνου άρχισε κατά τη δεκαετία 1960 και βασίστηκε πρωταρχικά στα αποτελέσματα της μελέτης Framingham.²

Ο ρόλος και η σχετική σημασία πολλών παραγόντων κινδύνου στην ανάπτυξη στεφανιαίας, περιφερικής και εγκεφαλικής αγγειοπάθειας έχουν αναγνωριστεί σε πειραματικές μελέτες, σε επιδημιολογικές μελέτες και σε κλινικές παρεμβατικές μελέτες.¹

Οι σημαντικότεροι από τους παράγοντες κινδύνου αναλύονται παρακάτω:¹

- Ηλικία και φύλο. Η ηλικία είναι ο ισχυρότερος ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση και ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Οι προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερες συχνότητες εμφάνισης της νόσου σε σχέση με τους άρρενες αντίστοιχης ηλικίας και κινδύνου. Ωστόσο, οι διαφορές λόγω φύλου αποκαθίστανται ταχέως μετά την εμμηνόπαυση.⁶
- Οικογενειακό ιστορικό. Η επίπτωση της νόσου μέσα σε μια οικογένεια είναι αυξημένη και μπορεί να οφείλεται σε ένα συνδυασμό γενετικών, περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και παραγόντων που αφορούν το τρόπο ζωής.¹
- Κάπνισμα. Υπάρχει ισχυρή, σταθερή και δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ του καπνίσματος και της εμφάνισης ισχαιμικής καρδιακής νόσου. Σε αγγειακό επίπεδο τα συστατικά του καπνού προκαλούν αγγειοσύσπαση και βλάβη στο ενδοθήλιο των αγγείων, το οποίο οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και δημιουργία αθηρωματικής πλάκας.¹
- Υπέρταση. Η αύξηση της αρτηριακής πίεσης είναι αρνητικός προγνωστικός παράγοντας οξέων καρδιαγγειακών περιστατικών. Από μελέτες φαίνεται ότι η αντιυπερτασική αγωγή μειώνει τη θνητότητα λόγω στεφανιαίας νόσου, αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων και καρδιακής ανεπάρκειας.¹

- Υπερχοληστερολαιμία. Ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και άλλων μορφών αρτηριοσκλήρυνσης αυξάνεται παράλληλα με τα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα. Η δυσλιπιδαιμία λόγω της υψίστης σημασίας της θα αναλυθεί περισσότερο παρακάτω.⁶
- Σακχαρώδης διαβήτης. Αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για όλες τις μορφές αθηροσκλήρωσης. Οι μεταβολικές διαταραχές και το οξειδωτικό στρες που χαρακτηρίζουν το σακχαρώδη διαβήτη προωθούν ιδιαίτερους μοριακούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στην αθηρωμάτωση. Επίσης οι αθηρωματικές πλάκες των διαβητικών είναι πιο εύθραυστες και πλουσιότερες σε λιπίδια. Είναι συχνότερη η εμφάνιση επιπλεγμένων αθηρωματικών πλακών με ενδοπλακική αιμορραγία και εξέλκωση. Γενικά η αθηρωμάτωση του σακχαρώδους διαβήτη χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και μικροαγγειοπάθειας.⁶
- Παράγοντες που σχετίζονται με την αιμόσταση. Άνθρωποι οι οποίοι έχουν διαταραχές του συστήματος πήξης εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης αθηρωματικής πλάκας με αιμορραγία ή αιμάτωμα.¹
- Φυσική δραστηριότητα. Η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας χονδρικά διπλασιάζει τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και αποτελεί ένα βασικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Η συστηματική άσκηση για 20 λεπτά, δυο ή τρεις φορές την εβδομάδα, φαίνεται πως έχει προστατευτική δράση, η οποία μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητά της να αυξάνει τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, να μειώνει την αρτηριακή πίεση, να μειώνει την πηκτικότητα του αίματος και να προάγει την ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας.¹
- Παχυσαρκία. Η παχυσαρκία, ιδιαιτέρως του κορμού, αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου που συνήθως συνοδεύεται από άλλους δυσμενείς παράγοντες όπως η υπέρταση, ο διαβήτης και η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας.¹
- Αλκοόλ και διαιτητικοί παράγοντες. Η κατάχρηση αλκοόλ σχετίζεται με εμφάνιση αρτηριακής υπέρτασης και αυξημένης συχνότητας καρδιακών συμβαμάτων. Χαμηλά επίπεδα βιταμινών, φρούτων και λαχανικών σχετίζονται με υψηλά επίπεδα λιπιδίων και οξειδωτικών μηχανισμών. Οι δίαιτες με μειωμένα επίπεδα φυλλικού οξέος, βιταμίνης 12 και βιταμίνης Β6 μπορούν να προκαλέσουν αύξηση των συγκεντρώσεων της ομοκυστεΐνης, η οποία συνδέεται με επιδεινούμενη αρτηριοσκλήρυνση, εμφάνιση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και περιφερικής αγγειοπάθειας.¹

Οι παράγοντες κινδύνου που αναφέρθηκαν μπορούν να διαχωριστούν σε δυο κατηγορίες, τους ελεγχόμενους και τους μη ελεγχόμενους. Οι ελεγχόμενοι παράγοντες κινδύνου είναι τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, η υψηλή αρτηριακή πίεση, το κάπνισμα, η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, η παχυσαρκία, η φτωχή διαίτα και ο διαβήτης. Οι μη ελεγχόμενοι αφορούν το οικογενειακό ιστορικό, την ηλικία και το φύλο.⁷ Άνθρωποι που εμφανίζουν τρεις από τους παραπάνω παράγοντες κινδύνου έχουν οχτώ φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν αθηροσκλήρωση.⁶

Μείζονες ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου	Νεότεροι παράγοντες κινδύνου
<ol style="list-style-type: none"> 1. Δυσλιπιδαιμία <ul style="list-style-type: none"> – Αύξηση ολικής και LDL-χοληστερόλης – Χαμηλή HDL-χοληστερόλη 2. Αρτηριακή υπέρταση 3. Σακχαρώδης διαβήτης και ινσουλινοαντοχή 4. Κάπνισμα 5. Οικογενειακό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Υπερομοκυστεϊναιμία 2. Αύξηση λιποπρωτεΐνης (α) 3. Υπερτριγλυκεριδαιμία 4. Υπερουριχαιμία 5. Αύξηση προθρομβωτικών παραγόντων (ινωδογόνο, PAI-1) 6. Αύξηση δεικτών φλεγμονής (ICAM-1, hs-CRP, IL-6) 7. Μεταβολικό σύνδρομο 8. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία 9. Μικρολευκωματινουρία
Ελάχιστες παράγοντες κινδύνου <ol style="list-style-type: none"> 1. Παχυσαρκία 2. Περιορισμός φυσικής δραστηριότητας 3. Προσωπικότητα 	

Σχήμα 2.1. Παράγοντες κινδύνου αθηρωματικής νόσου²

2.1 ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ

Η υπερλιπιδαιμία είναι βασικός παράγοντας της αθηροσκλήρωσης και των νοσημάτων που επακολουθούν, όπως η στεφανιαία νόσος και η περιφερική αγγειακή νόσος. Οι δυσλιπιδαιμίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη χοληστερόλη και LDL (low density lipoprotein), και χαμηλά επίπεδα HDL (high density lipoprotein) στο αίμα.⁸

Η χοληστερόλη κυκλοφορεί στο αίμα και μεταφέρεται με τις λιποπρωτεΐνες. Αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με το περιεχόμενο του λιπιδικού τους πυρήνα. Ταξινομούνται βάση της πυκνότητάς τους σε χυλομικρά, σε πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low density lipoprotein-VLDL), σε χαμηλής και σε υψηλής.⁹ Η LDL θεωρείται η «κακή χοληστερόλη» και στόχος είναι τα επίπεδά της να είναι χαμηλά. Παρακάτω αναλύεται λεπτομερώς πως η LDL, συμβάλλει στην αθηρογένεση.¹⁰ Η HDL είναι η «καλή χοληστερόλη» και τα επίπεδά της πρέπει να είναι υψηλά. Αυτά τα λιπίδια βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους και ρυθμίζονται από πολλαπλά μονοπάτια. Σε διαταραχή της ομοιόστασης του οργανισμού μπορεί να εμφανιστεί δυσλιπιδαιμία.

Οι διαταραχές των λιπιδίων διακρίνονται σε πρωτοπαθείς, οι οποίες είναι γενετικά καθορισμένες (χυλομικροναϊμία, οικογενής υπερχοληστερολαιμία, μικτή υπερλιπιδαιμία, οικογενής υπερτριγλυκεριδαιμία, οικογενής μείωση της HDL) και σε δευτεροπαθείς. Οι δευτεροπαθείς αφορούν διαταραχές των λιπιδίων που οφείλονται σε άλλα νοσήματα, όπως σακχαρώδης διαβήτης, υποθυρεοειδισμός, αποφρακτική ηπατική νόσος, χρόνια νεφρική νόσος-νεφρωσικό σύνδρομο, παχυσαρκία, κατάχρηση οινοπνεύματος ή και φάρμακα, όπως στεροειδή, διουρητικά σε μεγάλες δόσεις, β-αποκλειστές, αντιρετροϊκά, ιντερφερόνη, ρετινοειδή. Στις πρωτοπαθείς δίνεται φαρμακευτική αγωγή ενώ στις δευτεροπαθείς πρέπει να ρυθμιστούν πρώτα οι άλλοι παράγοντες και να εκτιμηθεί έπειτα η ανάγκη θεραπευτικής αγωγής.^{9,11}

Ταξινόμηση επιπέδων LDL, ολικής και HDL χοληστερόλης	
LDL χοληστερόλη	
<100	Βέλτιστο επίπεδο
100-129	Σχεδόν φυσιολογική ή λίγο αυξημένη
130-159	Οριακά υψηλή
160-189	Υψηλή
≥190	Πολύ υψηλή
Ολική χοληστερόλη	
<200	Επιθυμητή
200-239	Οριακά υψηλή
≥240	Υψηλή
HDL χοληστερόλη	
<40	Χαμηλή
≥60	Υψηλή

Σχήμα 2.2. Φυσιολογικές και παθολογικές τιμές των LDL, HDL και ολικής χοληστερόλης¹⁰

Σύμφωνα με κατευθυντήριες οδηγίες του ΕΟΦ η αντιμετώπιση της δυσλιπιδαιμίας στην πρόληψη από καρδιαγγειακή νόσο περιλαμβάνει τον καθορισμό ομάδας πληθυσμού για προληπτικό έλεγχο, προσδιορισμό παραγόντων κινδύνου, αλλαγή στον τρόπο ζωής και τέλος φαρμακευτική αγωγή.¹¹ Εάν η αξιολόγηση του σχετικού κινδύνου παραμένει ασαφής υπάρχουν δείκτες οι οποίοι μπορούν να το προσδιορίσουν όπως το Framingham score, PROCAM risk score, Reynold's risk score.⁸



FRAMINGHAM RISK SCORE to predict 10 year ABSOLUTE RISK of CHD EVENT



ST ALBANS & HEMEL HEMPSTEAD NHS TRUST : CARDIOLOGY DEPARTMENT

This risk assessment only applies to assessment for PRIMARY PREVENTION of CHD, in people who do not have evidence of established vascular disease. Patients who already have evidence of vascular disease usually have a >20% risk of further events of over 10 years, and require vigorous SECONDARY PREVENTION. People with a Family History of premature vascular disease are at higher risk than predicted; Southern Europeans and some Asians may have a lower risk in relation to standard risk factors.

STEP 1: Add scores by sex for Age, Total Cholesterol, HDL-Cholesterol, BP, Diabetes and Smoking. (If HDL unknown, assume 1.1 in Males, 1.4 in Females)

Age	Total Cholesterol		HDL Cholesterol		Systolic BP		Diastolic BP					Diabetes		Smoking				
	M	F	M	F	M	F	Male	<80	80-84	85-89	90-99	≥100	No	M	F	No	M	F
30-34	-1	-9	<4.1	-3 -2	<0.9	2 5	<120	0	0	1	2	3	No	0	0	No	0	0
35-39	0	-4	4.1 - 5.1	0 0	0.9 - 1.16	1 2	120-129	0	0	1	2	3	Yes	2	4	Yes	2	2
40-44	1	0	5.2 - 6.2	1 1	1.17 - 1.29	0 1	130-139	1	1	1	1	2	3					
45-49	2	3	6.3 - 7.1	2 1	1.30 - 1.55	0 0	140-159	2	2	2	2	3						
50-54	3	6	7.2	3 3	≥1.56	-2 -3	≥160	3	3	3	3	3						
55-59	4	7					Female	<80	80-84	85-89	90-99	≥100						
60-64	5	8					<120	-3	0	0	2	3						
65-69	6	8					120-129	0	0	0	2	3						
70-74	7	8					130-139	0	0	0	2	3						
							140-159	2	2	2	2	3						
							≥160	3	3	3	3	3						

If Systolic and Diastolic BP fall into different categories, use score from higher category

Categorisation of 10 year Risk of CHD Event	
Very Low risk	< 10%
Low risk	< 15%
Moderate risk	15-20%
High risk	> 20%

STEP 2: Use total score to determine Predicted 10 year Absolute Risk of CHD Event (Coronary Death, Myocardial Infarction, Angina) by sex

Total Score	≤-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	≥17
10 year Risk: Male	<2%	3%	3%	4%	5%	7%	8%	10%	13%	16%	20%	25%	31%	37%	45%	53%	53%	53%	53%	
10 year Risk: Female	<1%	2%	2%	2%	3%	3%	4%	4%	5%	6%	7%	8%	10%	11%	13%	15%	18%	20%	24%	27%

STEP 3: Compare Predicted 10 year Absolute Risk with "Average" and "Ideal" 10 year Risks, to give Relative Risks

Age	30 - 34	35 - 39	40 - 44	45 - 49	50 - 54	55 - 59	60 - 64	65 - 69	70 - 74
"Average" Male	3%	5%	7%	11%	14%	16%	21%	25%	30%
"Ideal" Male	2%	3%	4%	4%	6%	7%	9%	11%	14%
"Average" Female	<1%	<1%	2%	5%	8%	12%	12%	13%	14%
"Ideal" Female	<1%	1%	2%	3%	5%	7%	8%	8%	8%

"Ideal" risk represents
Total Cholesterol = 4.1 - 5.1
HDL = 1.2 (Male), 1.4 (Female)
BP < 120/80
No Diabetes, Non Smoker

People with an absolute risk of ≥20% should be considered for treatment: with a Statin to achieve a Total Cholesterol <5 and/or LDL cholesterol <3.2 with anti-hypertensives to achieve a BP ≤160/90 (ideally ≤140/80)

from Wilson PWF, et al Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation 1998;97:1837-47

Dr John Bayliss

Σχήμα 2.3. Ειδικός τρόπος υπολογισμού του καρδιαγγειακού κινδύνου που διατρέχει ένας ασθενής⁸

3. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ

Ένας ασθενής που πάσχει από αθηροσκλήρωση μπορεί να μην εμφανίζει συμπτώματα μέχρι το αγγείο να υποστεί σοβαρή στένωση, μηχανική απόφραξη του αυλού, εξέλκωση, θρόμβωση και περιφερική αθηρωματική εμβολή¹². Εάν συμβεί κάτι από τα παραπάνω οι επιπτώσεις μπορεί να είναι σοβαρές. Οι σημαντικότερες είναι η στεφανιαία νόσος, το εγκεφαλικό επεισόδιο, το παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο και η περιφερική αγγειακή νόσος.⁷

Η στεφανιαία νόσος μπορεί να προκληθεί από περιορισμένη αιματική ροή σε σημεία της καρδιάς. Η περιορισμένη αιματική ροή μπορεί να προκαλέσει πόνο στο θώρακα (στηθάγχη) και καρδιακή ανακοπή. Άλλες επιπλοκές συμπεριλαμβάνουν αποδυνάμωση του καρδιακού μυός ή καρδιακή ανεπάρκεια.⁷

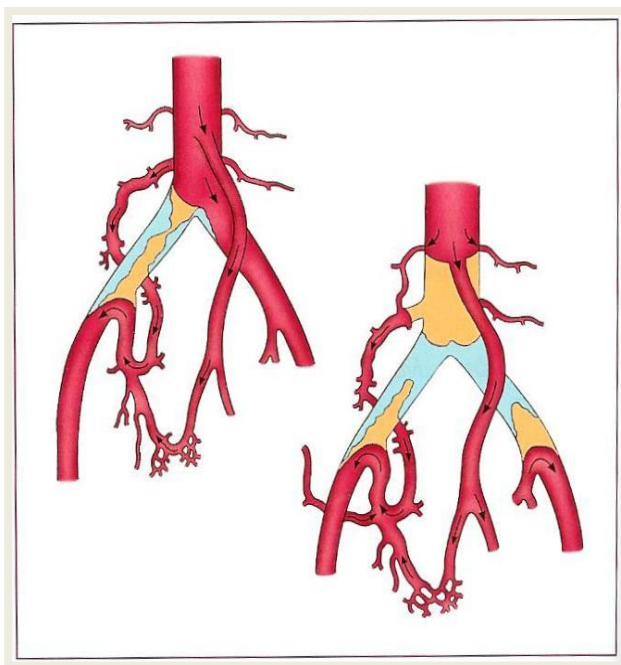
Το εγκεφαλικό και το παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο μπορεί να προκληθεί εάν η ροή αίματος αποκλεισθεί σε κάποιο σημείο/α του εγκεφάλου. Η κατάσταση αυτή μπορεί να είναι είτε μια παροδική κατάσταση η οποία αποκαθίσταται πλήρως, είτε ένα σοβαρό επεισόδιο που μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε θάνατο.⁷

Η περιφερική αγγειακή νόσος εμφανίζεται όταν περιορίζεται η αιματική ροή στα χέρια και στα πόδια. Μπορεί να προκαλέσει πόνο και μούδιασμα και εάν δεν αντιμετωπιστεί, μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση ιστού ή γάγγραινα.⁷

4. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Στις κλινικές εκδηλώσεις της αθηροσκλήρωσης περιλαμβάνονται η αρτηριακή ανεπάρκεια, το ανεύρυσμα και η εμβολή. Παρατηρούνται είτε μεμονωμένα, είτε μπορεί να συνυπάρχουν.¹³

Η αρτηριακή ανεπάρκεια ή κυκλοφορική μειωμένη αιματική ροή, μπορεί να προκληθεί από αθηροσκληρωτικές πλάκες που έχουν μεγαλώσει τόσο ώστε να προκαλούν στένωση του αρτηριακού αυλού. Το αιμοδυναμικό κύκλωμα απεικονίζεται με την αγγειογραφία. Συνήθως



περιλαμβάνει την πάσχουσα αρτηρία, ένα παράλληλο σύστημα παράπλευρων αγγείων και το περιφερικό αρτηριακό δίκτυο.¹³ Τα παράπλευρα αγγεία είναι πολύ μικρότερα, κυκλοτερή και πολυάριθμα από τις μείζονες αρτηρίες που αντικαθιστούν και πάντα έχουν μεγαλύτερη αντοχή από την αρχική αρτηρία που υποκαθιστούν. Αυτό που προκαλεί την παράπλευρη ανάπτυξη είναι η μη φυσιολογική αύξηση της πίεσης σε όλο το μήκος του παράπλευρου συστήματος και η αυξημένη ταχύτητα ροής. Όταν η στένωση έχει γίνει

Σχήμα 4.1. Ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας σε απόφραξη της δεξιάς κοινής λαγονίου αρτηρίας και του διχασμού της αορτής¹²

σχεδόν απόφραξη καταλήγει σε θρόμβωση. Ο θρόμβος διαδίδεται στη στάσιμη στήλη αίματος κεντρικά και περιφερικά, ως τους πρώτους μείζονες παράπλευρους αρτηριακούς κλάδους και το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα τμήμα να έχει φραγεί τελείως και να παρακάμπτεται από ένα παράπλευρο σύστημα.¹³

Παρά το γεγονός ότι η αθηροσκλήρωση γενικά προκαλεί στένωση της αρτηρίας, μπορεί να σχετίζεται με εκφυλιστικά ανευρύσματα. Η σύνδεση μεταξύ των δυο νόσων δεν είναι ξεκάθαρη. Οι άνθρωποι με αρτηριακά ανευρύσματα εμφανίζουν πολλούς κοινούς παράγοντες κινδύνου με τους ασθενείς με αθηροσκλήρωση και το ανευρυσματικό τοίχωμα εμφανίζει συχνά αθηροσκλήρωση.¹³

Η εμβολή οφείλεται σε κομμάτια πλάκας ή θρόμβου που μπορούν να προκαλέσουν περιφερικά αρτηριακή απόφραξη. Τα συμπτώματα που προκαλεί ένα έμβολο εξαρτώνται από το μέγεθός του, το προσβεβλημένο όργανο και την αρτηριακή του ανατομία.¹³ Τα έμβολα αποτελούν τον πρωτοπαθή μηχανισμό εγκεφαλικού επεισοδίου από καρωτιδική αθηροσκλήρωση.

5. ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

5.1 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Η περιφερική αρτηριακή ανεπάρκεια αποτελεί βασική ασθένεια των κάτω άκρων και εμφανίζει συνήθως συμπτώματα σε σχέση με των άνω άκρων, η οποία λόγω πολλών παράπλευρων οδών σπάνια εμφανίζει συμπτώματα. Η περιφερική αρτηριακή ανεπάρκεια προσβάλλει τουλάχιστον 20% των ατόμων άνω των 70 ετών και μπορεί να οδηγήσει σε γάγγραινα, ακρωτηριασμό, μέχρι και σε θάνατο.¹³

Τα κυριότερα συμπτώματα που παρατηρούνται όταν υπάρχουν οι κλινικές εκδηλώσεις είναι:¹³

1. Διαλείπουσα χωλότητα. Πόνος ή κόπωση στους μύες των κάτω άκρων. Ο πόνος και η κόπωση προκαλούνται από το περπάτημα και ανακουφίζονται από την ανάπαυση. Ο πόνος είναι ένα βαθύ άλγος που προοδευτικά αυξάνεται φτάνοντας σε τέτοιο βαθμό που αναγκάζει τον ασθενή να μην περπατάει.

2. Ισχαιμικό πόνος κατά την ανάπαυση. Είναι ένα σοβαρό σύμπτωμα που προκαλείται από την ισχαιμική νευρίτιδα και νέκρωση των ιστών και δηλώνει προχωρημένη αρτηριακή ανεπάρκεια που συνήθως καταλήγει σε γάγγραινα και ακρωτηριασμό των άκρων.
3. Μη επουλώσιμα έλκη. Εντοπίζονται συνήθως στα πόδια και προκαλούνται από φαινομενικά επιπόλαιους τραυματισμούς. Είναι εξαιρετικά οδυνηρά, βαθιά και δε δίνουν κανένα στοιχείο επούλωσης όπως συστολή ή σχηματισμό κοκκιώδους ιστού. Η αληθής γάγγραινα τελικά προσβάλλει αυτές τις εξελκώσεις.
4. Στυτική δυσλειτουργία. Η ανικανότητα του ατόμου να αποκτήσει ή να διατηρήσει τη στύση του, μπορεί να είναι αποτέλεσμα βλαβών που εμποδίζουν τη ροή του αίματος μέσω και των δυο έσω λαγόνιων αρτηριών και συχνά σχετίζεται με την απόφραξη της τελικής αορτής.
5. Αίσθηση. Οι αισθητηριακές ανωμαλίες απουσιάζουν γενικά κατά την εξέταση παρά το γεγονός ότι κάποιοι ασθενείς αναφέρουν μουδιάσματα.

5.2 ΣΗΜΕΙΑ

Η σωματική εξέταση είναι πολύ σημαντική και βοηθά στην αξιολόγηση της παρουσίας και σοβαρότητας της αγγειακής νόσου. Τα σωματικά ευρήματα της περιφερικής αθηροσκλήρωσης σχετίζονται με αλλαγές στις περιφερικές αρτηρίες και ισχαιμία ιστών.

Τα σημαντικότερα σημεία που εξετάζονται είναι :¹³

1. Αρτηριακή ψηλάφηση
2. Φυσήματα
3. Ωχρότητα
4. Αντιδραστική υπεραιμία
5. Ερυθρότητα
6. Αντίδραση στην άσκηση
7. Θερμοκρασία
8. Έλκος
9. Νέκρωση
10. Ατροφία
11. Δερματικές αλλαγές

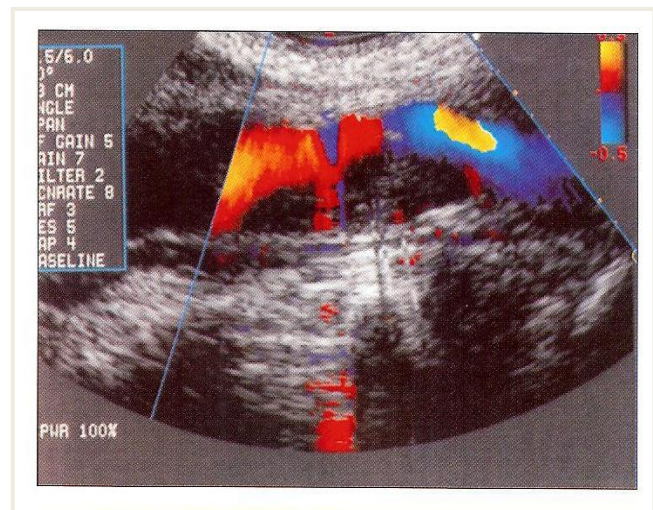
5.3 ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Η μη επεμβατική εκτίμηση είναι χρήσιμη στον καθορισμό της σοβαρότητας της υπο-άρδευσης και των περιοχών σημαντικών αιμοδυναμικώς στενώσεων και αποφράξεων. Μερικές από τις δοκιμές είναι η μέτρηση της συστολικής πίεσης του αίματος κατά την ανάπαυση, στη βραχιόνια αρτηρία και την οπίσθια κνημιαία ή ραχιαία του ποδός αρτηρία. Η τμηματική μέτρηση της πίεσης των άκρων ανιχνεύει με ακρίβεια και τμηματικά εντοπίζει αιμοδυναμικά σημαντικές αποφρακτικές βλάβες μεγάλων αγγείων. Άλλος ένας τρόπος είναι οι καταγραφές τμηματικού πληθυσμογραφικού παλμικού όγκου.¹³

5.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ

Οι μέθοδοι απεικόνισης για διαγνωστική προσέγγιση περιλαμβάνουν:¹⁴

- Την έγχρωμη duplex απεικόνιση ή το έγχρωμο υπερηχογράφημα, το οποίο από μελέτες έχει φανεί ότι είναι το ίδιο αξιόπιστο με την αγγειογραφία σε ποσοστό 85-100%.
- Την αγγειογραφία, η οποία είναι επεμβατική μέθοδος και επομένως είναι καλό να γίνεται με συγκεκριμένες ενδείξεις.
- Την μαγνητική αγγειογραφία, η οποία είναι επίσης επεμβατική αλλά με λιγότερες επιπλοκές.
- Την αξονική τομογραφία η οποία απαιτεί τη χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας. Θεωρείται ως η σύγχρονη απεικονιστική μέθοδος και αποτελεί εξαιρετική εναλλακτική της αγγειογραφίας.



Σχήμα 5.1. Έγχρωμη υπερηχογραφία καρωτιδικής νόσου. Μαλθακή πλάκα στην έσω καρωτίδα, αρτηρία προκαλούσα στένωση 80-85% του αυλού του αγγείου¹³

6. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Στόχος της θεραπείας είναι η ανακούφιση των συμπτωμάτων και η πρόληψη της απώλειας των άκρων. Στα κάτω άκρα, ο στόχος είναι η διατήρηση της βάδισης και στα δυο πόδια. Η θεραπεία συχνά ανταποκρίνεται στα συμπτώματα. Για τη νόσο των εγκεφαλικών αγγείων, ο στόχος είναι η πρόληψη εγκεφαλικού επεισοδίου, ενώ για τα ανευρύσματα είναι η πρόληψη της ρήξης και του θανάτου. Το ιδανικό είναι η θεραπεία να γίνεται προφυλακτικά. Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τη διάγνωση μιας ασυμπτωματικής βλάβης πριν από ένα καταστροφικό γεγονός.¹³

Γενικά, ασθενείς με περιφερική αγγειακή νόσο έχουν μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης. Οι μη διαβητικοί ασθενείς με ισχαιμική νόσο των κάτω άκρων έχουν διάρκεια επιβίωσης 5 ετών σε ποσοστό 70%. Το ποσοστό επιβίωσης είναι 60% σε ασθενείς με σχετική ισχαιμική καρδιακή νόσο ή εγκεφαλοαγγειακή ανεπάρκεια. Ασθενείς με περιφερική αγγειακή νόσο και νεφρική ανεπάρκεια έχουν διάρκεια επιβίωσης 2 έτη σε ποσοστό μικρότερο από 50%. Οι περισσότεροι θάνατοι οφείλονται σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Μόνο το 20% των θανάτων οφείλεται σε μη αθηροσκληρωτικά αίτια.¹³

Η θεραπεία του ασθενούς περιλαμβάνει τρεις κατευθύνσεις, την θεραπευτική αντιμετώπιση, την ενδαγγειακή θεραπεία και τη χειρουργική θεραπεία.¹³

- Η θεραπευτική αντιμετώπιση περιλαμβάνει τη μείωση των παραγόντων κινδύνου, την άσκηση αποκατάστασης, τη φροντίδα ποδιών και τη φαρμακοθεραπεία. Αναλυτικότερα, το κάπνισμα είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και οι ασθενείς πρέπει να σταματούν να καπνίζουν. Επίσης η υπέρταση καθώς και τα επίπεδα των λιπιδίων πρέπει να ελέγχονται. Οι στατίνες είναι εξαιρετικά αποτελεσματικές στη μείωση της LDL χοληστερόλης. Άλλοι αντι-υπερλιπιδαιμικοί παράγοντες είναι η νιασίνη, οι ρητίνες, τα ιχθυέλαια, οι φιμπράτες, οι στατίνες και η εξετιμίμπη. Επιπλέον, ο διαβήτης τύπου 1 και 2 αυξάνουν την επίπτωση και σοβαρότητα της καρδιαγγειακής νόσου. Πρέπει να γίνεται εντατικός γλυκαιμικός έλεγχος και να διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα της γλυκόζης.

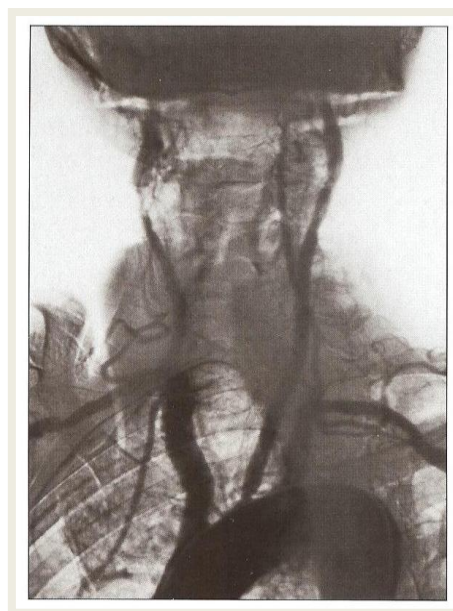
Η άσκηση, από χαλαρό περπάτημα έως συστηματική ελεγχόμενη άσκηση, βελτιώνει σημαντικά την ικανότητα βάρδισης. Πιθανότατα βελτιώνεται η μεταβολική δραστηριότητα των μυών με αποτέλεσμα να βοηθάει στην ικανότητα βάρδισης.

Τα πόδια πρέπει να παρακολουθούνται, να πλένονται καθημερινά και να διατηρούνται στεγνά. Ο ασθενής πρέπει να φοράει καθαρές βαμβακερές κάλτσες και καλά εφαρμοζόμενα παπούτσια για να αποφεύγονται οι κακώσεις, ιδιαίτερα στους διαβητικούς ασθενείς.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία μειώνει τα θανατηφόρα και μη θανατηφόρα καρδιαγγειακά συμβάματα. Η ασπιρίνη θεωρείται εδώ και χρόνια πρώτης γραμμής θεραπεία, σε δόσεις των 75 με 350mg/d. Η κλοπιδογρέλη, η οποία εμποδίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με αναστολή του μονοπατιού ADP, επίσης χρησιμοποιείται σε δόση 75mg/d.

Για την αντιμετώπιση της διαλείπουσας χωλότητας χρησιμοποιείται η πεντοξυφυλλίνη, η οποία βελτιώνει το σχήμα των ερυθροκυττάρων, ελαττώνει τα επίπεδα ινωδογόνου και τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων.

- Η διαδερμική διαυλική αγγειοπλαστική (PTA) συνιστάται για τη διαστολή ενός αγγειακού τμήματος με στένωση, με τη χρήση καθετήρα με διαστελλόμενο μπαλόνι. Καθώς το μπαλόνι διατείνεται συμπιέζει το μέσω και έξω χιτώνα, σπάζοντας τις αθηρωματικές πλάκες και διατείνει το αγγείο έτσι ώστε να διατείνεται και ο αυλός του αγγείου. Επίσης η αθηρεκτομή ή ενδαρτηρεκτομή, είναι μια ενδαγγειακή διαδικασία κατά την οποία η πλάκα αφαιρείται τμηματικά με ειδικό καθετήρα τομής ή περιστροφής.



Σχήμα 6.1. Αγγειογραφία αορτικού τόξου-αγγείων τραχήλου. Μεγάλη στένωση κατά το διχασμό της δεξιάς κοινής καρωτίδας αρτηρίας και μικρότερη στην έκφυση της αριστεράς κοινής.¹⁴

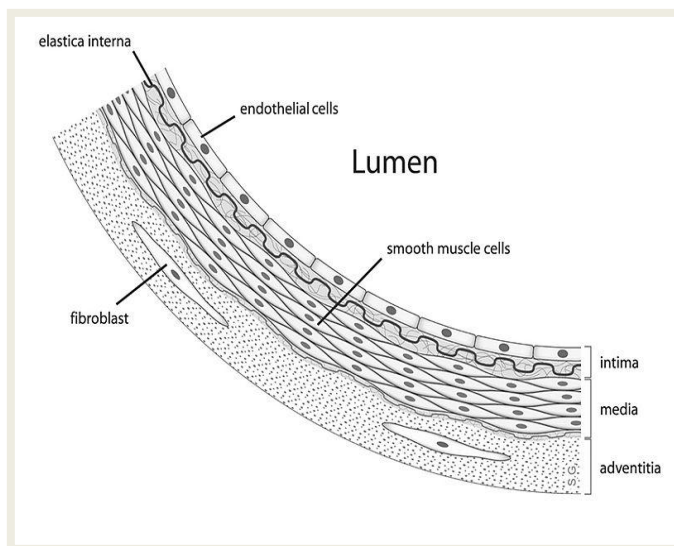
- Η αγγειοχειρουργική επέμβαση γίνεται για τη διάσωση του άκρου και για περιορισμό της διαλείπουσας χωλότητας. Η επιλογή του είδους της χειρουργικής επέμβασης εξαρτάται από τη θέση και την κατανομή των αρτηριακών βλαβών και την παρουσία ή όχι συνυπάρχουσας νόσου.

7. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

7.1 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Έχουν γίνει πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια γύρω από την έναρξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και η επιστημονική κοινότητα έχει καταλήξει σε μια πολυπαραγοντική θεωρία, όπου το κρίσιμο και κοινό πρωταρχικό βήμα είναι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η οποία πυροδοτεί διαδοχικά γεγονότα που οδηγούν στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών.¹⁵

Τα αγγεία αποτελούνται από ένα εκτεταμένο δίκτυο αρτηριών, τριχοειδών και φλεβών με τη βοήθεια του οποίου διατηρείται η ομοιόσταση των κυττάρων. Τα περισσότερα αγγεία αποτελούνται από τρεις διακριτές περιοχές. Τον έσω χιτώνα (tunica intima), ενδοθήλιο, που αποτελείται από μια μονήρης στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων που καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια του αγγειακού τοιχώματος.^{2,16} Κάτω από αυτή βρίσκεται το υπενδοθηλιακό στρώμα



Σχήμα 7.1. Απεικόνιση τοιχώματος αγγείου⁸

και το έσω ελαστικό πέταλο που προσδίδει ευκαμψία και σταθερότητα στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο μέσος χιτώνας (tunica media), ο οποίος αποτελείται κυρίως από λεία μυϊκά κύτταρα και ελαστικές ίνες και ο έξω χιτώνας που περιέχει αποκλειστικά ινοελαστικό συνδετικό ιστό. Η αθηρωματική πλάκα σχηματίζεται κυρίως στο μεσαίο στρώμα της μεμβράνης του αγγείου, ανάμεσα από τον έσω και το μέσο χιτώνα.

Η υπολογιζόμενη επιφάνεια που καλύπτει το ενδοθήλιο σε όλο το σώμα είναι περισσότερο από 150m² και ρυθμίζει την αγγειακή αιμάτωση, τη διαπερατότητα και τη ροή του αίματος.¹⁵ Το ενδοθήλιο παίζει ζωτικό ρόλο στην αγγειακή ομοιόσταση, στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών λευκοκυττάρων. Σε διάφορα μηχανικά και χημικά ερεθίσματα τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν και απελευθερώνουν ένα μεγάλο αριθμό αγγειοδραστικών ουσιών, ρυθμιστών ανάπτυξης και άλλων παραγόντων που μεσολαβούν σε τέτοιες λειτουργίες.¹⁷

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία ορίζεται ως «η μερική ή ολική έλλειψη ισορροπίας μεταξύ αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσπαστικών ουσιών, αυξητικών και μη αυξητικών παραγόντων, προ-αθηρογενών και αντι-αθηρογενών ουσιών.»¹⁸ Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία θεωρείται πλέον καθοριστικό γεγονός στην αθηρογένεση και προηγείται των κλινικών συμπτωμάτων λόγω αθηρωματικών πλακών στα αγγεία.^{19,20}

Συγκεκριμένα μειώνεται η βιοδιαθεσιμότητα αγγειοδιασταλτικών ουσιών, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), ενώ αγγειοσυσπαστικοί παράγοντες αυξάνονται. Πέρα από την ενδοθηλιακή διαταραχή, γίνεται μια «ενδοθηλιακή ενεργοποίηση» η οποία χαρακτηρίζεται από έκκριση προφλεγμονωδών, πολλαπλασιαστικών και ουσιών πήξης που ευνοούν όλα τα στάδια της αθηρογένεσης.¹⁷

Ρύθμιση αγγειακού τόνου

Αγγειοδιασταλτικές ουσίες

- Οξείδιο αζώτου (NO)
- Προστακυκλίνη (PGI₂)
- Βραδυκινίνη
- Υπερπολωτικός ενδοθηλιακός παράγοντας (EDHF)

Αγγειοσυσπαστικές ουσίες

- Ενδοθηλίνη-1 (ET-1)
- Προστανοειδή
 - θρομβοξάνη (TXA₂)
 - προσταγλανδίνη-H₂ (PGH₂)
- Αγγειοτασίνη-II

Ρύθμιση ηλεκτρικής-δρoμογένεσης

Αντιθρομβωτικές ουσίες

- Οξείδιο αζώτου (NO)
- Ενεργοποιητής ιστικού πλασμινογόνου (t-PA)
- Ηπαρίνες
- Προστακυκλίνη (PGI₂)
- Θρομβομοντουλίνη

Προθρομβωτικές ουσίες

- Αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 (PAI-1)
- Παράγοντας von Willebrand (vWF)
- Προστανοειδή (TXA₂)
- Ιστικός παράγοντας (TF)
- Ενδοθηλίνη-1 (ET-1)

Ρύθμιση αγγειακών φλεγμονωδών-ανοσολογικών μηχανισμών

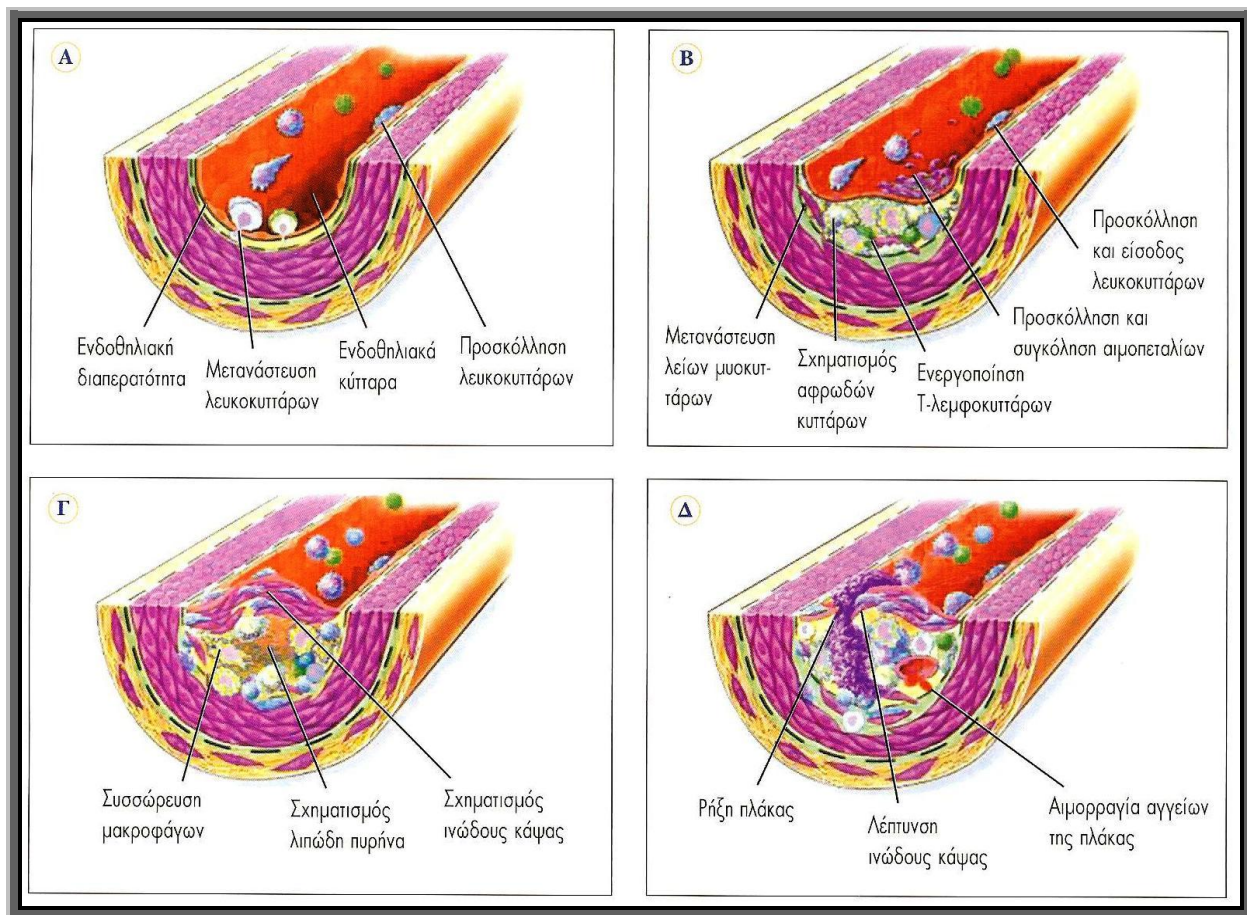
- Μόρια προσκόλλησης
 - διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1)
 - αγγειακό μόριο προσκόλλησης-1 (VCAM-1)
 - σελεκτίνες (E-, P-)
- Χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1 (MCP-1)
- Κυτταροκίνες
 - ιντερλευκίνες
 - παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF)

Σχήμα 7.2. Κύριες βιολογικά δραστικές ουσίες που παράγονται από το αγγειακό ενδοθήλιο και ο ρυθμιστικός τους ρόλος²

7.2 ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ

7.2.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ

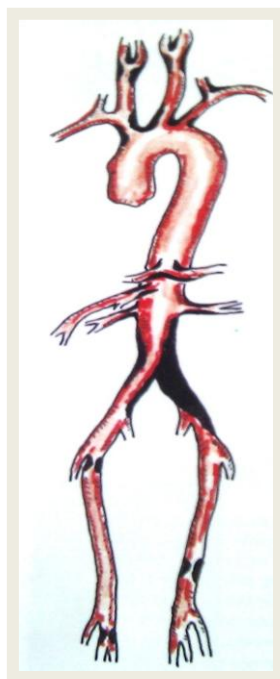
Η παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης ξεκινά με την έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια του ενδοθηλίου, τα οποία αλληλεπιδρούν με λευκοκύτταρα. Το δυσλειτουργικό ενδοθήλιο ρυθμίζει τη διαπερατότητα των λιποπρωτεϊνών, την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, την απελευθέρωση των προθρομβωτικών και αντιθρομβωτικών παραγόντων, των παραγόντων ανάπτυξης και των αγγειοδραστικών ουσιών.²¹ Αυτό επιβεβαιώνεται από την έντονη συσχέτιση –μέσω πολλαπλών κλινικών μελετών- μεταξύ καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου (κάπνισμα, υπερλιπιδαιμία, υπέρταση, παχυσαρκία, διαβήτης, λοίμωξη και φλεγμονή) και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, καθώς και από το γεγονός ότι η σωστή διαχείριση των ανωτέρω παραγόντων οδηγεί σε βελτιστοποίηση της ενδοθηλιακής λειτουργίας.²²



Σχήμα 7.3. Αναλυτικά τα κύρια στάδια δημιουργίας μιας αθηρωματικής πλάκας μέχρι τη ρήξη της. Α: Οι αρχικές μεταβολές που συμβαίνουν λόγω ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Β: Η συσσώρευση αφρωδών κυττάρων και ο σχηματισμός λιπώδους γράμμουσης. Γ: Αθήρωμα Δ: Ραγείσα αθηρωματική πλάκα.^{2,20}

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτίθενται σε τριών ειδών μηχανικές δυνάμεις: την υδροστατική πίεση από το αίμα μέσα στο αγγείο, το περιμετρικό στρες λόγω της κινητικότητας του αγγείου και τη διατμητική τάση από τη ροή του αίματος μέσα στο αγγείο. Από τα παραπάνω η τελευταία φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς διεγείρει την απελευθέρωση αγγειοδραστικών ουσιών και αλλάζει τη γονιδιακή έκφραση, τον κυτταρικό μεταβολισμό και τη μορφολογία.²³ Αυτό επιβεβαιώνεται από την έντονη παρουσία αθηρωμάτωσης σε μικρότερους κλάδους ή σημεία διακλάδωσης του αγγειακού δένδρου όπου υπάρχει αυξημένη διατμητική τάση.²⁴

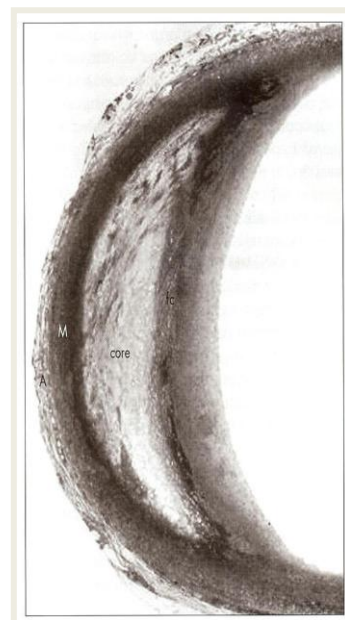
Τα δυσλειτουργικά ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως αναφέρθηκε, εκφράζουν μόρια προσκόλλησης στην επιφάνειά τους πάνω στα οποία συνδέονται τα μονοκύτταρα. Έπειτα αυτά μεταναστεύουν στον υπενδοθηλιακό ιστό όπου και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Η εισαγωγή των φλεγμονωδών κυττάρων μέσα στο ενδοθήλιο εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των



μορίων προσκόλλησης και των αντίστοιχων συνδετικών θέσεων στα λευκοκύτταρα. Η κυτταροκίνη MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) είναι μια σημαντική πρωτεΐνη η οποία παράγεται από τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα και προκαλεί την άμεση μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Ο M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) είναι ένας ενεργοποιητής ο οποίος επάγει την έκφραση των υποδοχέων εκκαθαριστών στα μακροφάγα και προωθεί τον πολλαπλασιασμό τους ώστε να σχηματιστεί αθηρωματική πλάκα. Η πρωτεΐνη VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) μεσολαβεί στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων, μονοκυττάρων, ηωσινόφιλων και βασεόφιλων στο αγγειακό ενδοθήλιο και συμμετέχει στο μονοπάτι μετάδοσης της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Σχήμα 7.4. Σχηματική απεικόνιση της εκλεκτικής προτίμησης της ανάπτυξης των αθηρωματικών πλακών στις εκφύσεις και στους διχασμούς των αρτηριών¹²

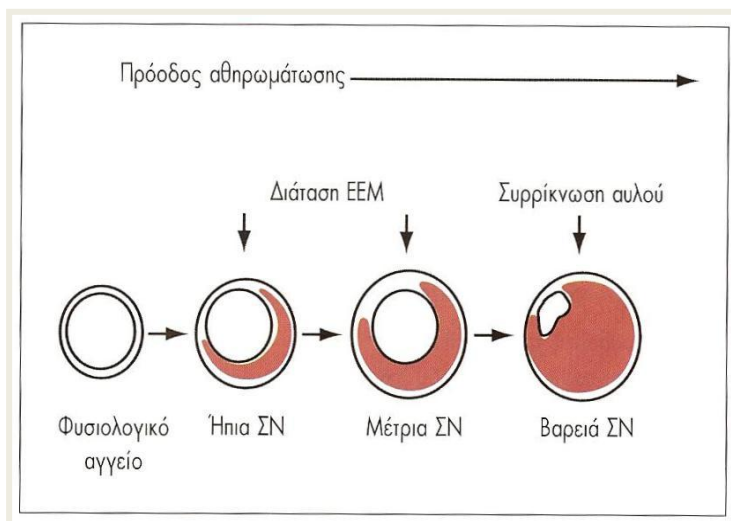
Σχήμα 7.5. Μικροφωτογραφία βλάβης τύπου IV μετά από μεγέθυνση (x55). Φαίνεται στο κέντρο ο λιπόδης πυρήνας (core). Μεταξύ του πυρήνα και του ενδοθηλίου υπάρχουν άφθονα μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα (fc), αλλά χωρίς ιδιαίτερη αύξηση των λείων μυϊκών κυττάρων ή των ινών κολλαγόνου. A: Έξω ή ινώδης χιτώνας, M: Μυϊκός χιτώνας^{2,25}



Η βλάβη του ενδοθηλίου επιτρέπει την είσοδο LDL λιποπρωτεϊνών. Η LDL χοληστερόλη συσσωρεύεται μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα και οξειδώνεται σε ox-LDL.²⁶ Τα μονοκύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί σε μακροφάγα, προσλαμβάνουν την LDL με αλόγιστο ρυθμό και την οξειδώνουν περαιτέρω. Επιπλέον η ox-LDL είναι ικανή και αυτή με τη σειρά της να διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα για να εκφράσουν φλεγμονώδη μόρια.

Η πλήρως οξειδωμένη LDL αναγνωρίζεται από τον εκκαθαριστικό φορέα των μακροφάγων, φαγοκυτταρώνεται και τα κύτταρα αυτά μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Η υπενδοθηλιακή συγκέντρωση αφρωδών κυττάρων χαρακτηρίζει τις λιπώδεις γραμμώσεις που αποτελούν την πρώτη αναγνωρίσιμη μακροσκοπικά αθηρωματική βλάβη.

Τα αφρώδη κύτταρα τελικά πεθαίνουν και επιτείνουν περαιτέρω τη φλεγμονώδη διαδικασία. Επίσης παρατηρείται πολλαπλασιασμός και μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων από το μέσω χιτώνα στον έσω χιτώνα ως απάντηση σε κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα



ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη καθώς και σε αιμοπετάλια. Τα λεία μυϊκά κύτταρα προσλαμβάνουν τα λιπίδια, αντικαθίστανται από κολλαγόνο και μετατρέπονται και αυτά με τη σειρά τους σε αφρώδη κύτταρα. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό μιας ινώδους κάψας, η οποία περιβάλλει τις λιπώδεις γραμμώσεις.

Σχήμα 7.6. Η αύξηση της αθηρωματικής πλάκας σε πρώιμα στάδια συνοδεύεται από αντισταθμιστική αύξηση του μεγέθους του αγγείου (θετική αναδιαμόρφωση – remodeling), λόγω διάτασης της έξω ελαστικής μεμβράνης (EEM). Με την πρόοδο όμως της αθηρωμάτωσης, δεν προκαλείται περαιτέρω διάταση της EEM και οδηγείται το αγγείο σε απόφραξη ή ρήξη.²

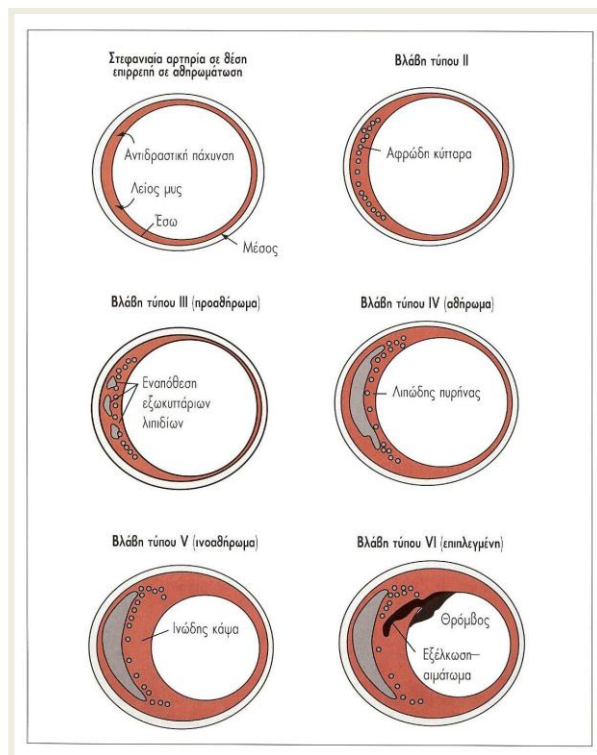
Αυτή η κάψα με λιπιδικό περιεχόμενο, που αποκαλείται πλέον αθήρωμα, παράγει ένζυμα τα οποία οδηγούν σε μεγέθυνση του αγγείου. Ενώ αρχικά το αγγείο αντισταθμίζει την κατάσταση αυτή με θετική αναδιαμόρφωση (positive remodeling), φτάνει σε ένα σημείο που δεν μπορεί να

το κάνει πια. Τότε η βλάβη αρχίζει να προεξέχει μέσα στον αυλό εμποδίζοντας την κυκλοφορία του αίματος.

7.2.2 ΤΥΠΟΙ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Οι αθηρωματικές πλάκες χαρακτηρίζονται από διάφορες μορφές και στάδια εξέλιξης, όπως αναφέρθηκε και αναλυτικά προηγουμένως και ενδέχεται να διαφέρουν σημαντικά στη μορφολογία ακόμα και στον ίδιο ασθενή.

Οι πρώιμες βλάβες (βλάβη τύπου I) περιέχουν αφρώδη κύτταρα. Τα αφρώδη κύτταρα ωριμάζουν και διηθούνται από λεία μυϊκά κύτταρα και λιπίδια και οργανώνονται σε στιβάδες ή λιπώδεις γραμμώσεις (βλάβη τύπου II). Εν συνεχεία, εναποτίθεται συνδετικός ιστός και συσσωρεύονται εξωκυττάρια μικροσταγονίδια λίπους (βλάβη τύπου III ή προαθήρωμα). Οι παραπάνω βλάβες συνήθως αναπτύσσονται τις τρεις πρώτες δεκαετίες της ζωής σε σημεία των στεφανιαίων αγγείων με στροβιλώδη ροή.²



Σχήμα 7.7. Σχηματική παράσταση των διαφορετικών τύπων αθηρωματικών βλαβών σε εγκάρσιες τομές

Η βλάβη τύπου IV (ή αθήρωμα) περιέχει μεγάλη ποσότητα εξωκυττάρων λιπιδίων και καταλαμβάνει μια εκτεταμένη, αλλά καλώς περιγεγραμμένη περιοχή του έσω αγγειακού χιτώνα. Το τμήμα της βλάβης ονομάζεται λιπώδης πυρήνας. Αυτή η βλάβη θεωρείται η πρώτη προχωρημένη βλάβη, λόγω της αποδιοργάνωσης που επιφέρει ο λιπώδης πυρήνας στη δομή του έσω χιτώνα. Δεν προκαλεί όμως πάντα στένωση το αθήρωμα λόγω θετικής αναδιαμόρφωσης (positive remodeling). Ο ιστός που παρεμβάλλεται μεταξύ λιπώδους πυρήνα και αγγειακού αυλού αποτελείται από μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα, σταγονίδια λίπους, λεμφοκύτταρα, μαστοκύτταρα και πολλά τριχοειδή. Η πυκνότητα αυτών των στοιχείων είναι μεγαλύτερη περιφερικά της βλάβης.²

Τύπος πλάκας	Χαρακτηριστικά	Κλινικές εκδηλώσεις
I	Πάχυνση του έσω χιτώνα, μακροφάγα, μεμονωμένα αφρώδη κύτταρα	Χωρίς συμπτώματα
II (Λιπώδης γράμμωση)	Ενδοκυτάρια αφομοίωση λίπους από τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα	Χωρίς συμπτώματα
III (Προαθήρωμα)	Όπως παραπάνω και επιπλέον εναπόθεση εξωκυττάριου λίπους και συνδετικού ιστού	Χωρίς συμπτώματα
IV (Αθήρωμα)	Μεγάλος εξωκυττάριος λιπώδης πυρήνας στον έσω χιτώνα, διήθηση από μακροφάγα, αφρώδη κύτταρα και T-λεμφοκύτταρα	Συνήθως χωρίς συμπτώματα, ενίοτε σταθερή σπθάγχη
Va	Αθήρωμα με ινώδη (-εις) στοιβάδα (-ες)	Συνήθως χωρίς συμπτώματα, ενίοτε σταθερή σπθάγχη
Vb	Αθήρωμα με εκτεταμένη ασβέστωση στον λιπώδη πυρήνα ή σε άλλο σημείο της βλάβης	Σταθερή σπθάγχη, ενίοτε χωρίς συμπτώματα
Vc	Ινώδες αθήρωμα ή οργανωμένος τοιχωματικός θρόμβος με ελάχιστο ή καθόλου λιπώδη πυρήνα	Σταθερή σπθάγχη, ενίοτε χωρίς συμπτώματα
VI (Επιπλεγμένη βλάβη)	Ρήξη βλάβης τύπου IV ή V με ενδοτοιχωματική αιμορραγία και/ή υπερκείμενο θρόμβο	Οξύ ισχαιμικό σύνδρομο ή χωρίς συμπτώματα

Σχήμα 7.8. Τύποι αθηρωματικών πλακών²

Όταν ο έσω αγγειακός χιτώνας αρχίσει να διηθείται έντονα από κολλαγόνο και εξωκυττάρια ουσία, τότε σχηματίζεται στιβάδα ινώδους κάψας και η βλάβη χαρακτηρίζεται ως ινοαθήρωμα (βλάβη τύπου V). Αυτές διαιρούνται σε τύπου i) Va όταν η ινώδης κάψα περιβάλλει ένα σαφώς οριζόμενο λιπώδη πυρήνα, ii) τύπου Vb όταν έχει ασβεστωθεί ο λιπώδης πυρήνας ή άλλα μέρη της βλάβης, iii) τύπου Vc όταν ο λιπώδης πυρήνας δεν διακρίνεται καθόλου ή διακρίνεται λίγο λόγω έντονης ασβέστωσης.²

Τέλος, η βλάβη τύπου VI αφορά τη διάρρηξη του έσω χιτώνα και το σχηματισμό ρωγμών και εξελκώσεων. Ιδιαίτερα ευάλωτες στη ρήξη είναι οι βλάβες τύπου IV λόγω αυξημένου αριθμού μακροφάγων στην περιφέρεια. Όταν απλά λύεται η συνέχεια του έσω χιτώνα έχουμε βλάβη τύπου VIa. Όταν υπάρχει αιμάτωμα ή αιμορραγία έχουμε VIb και με θρόμβο, VIc.²

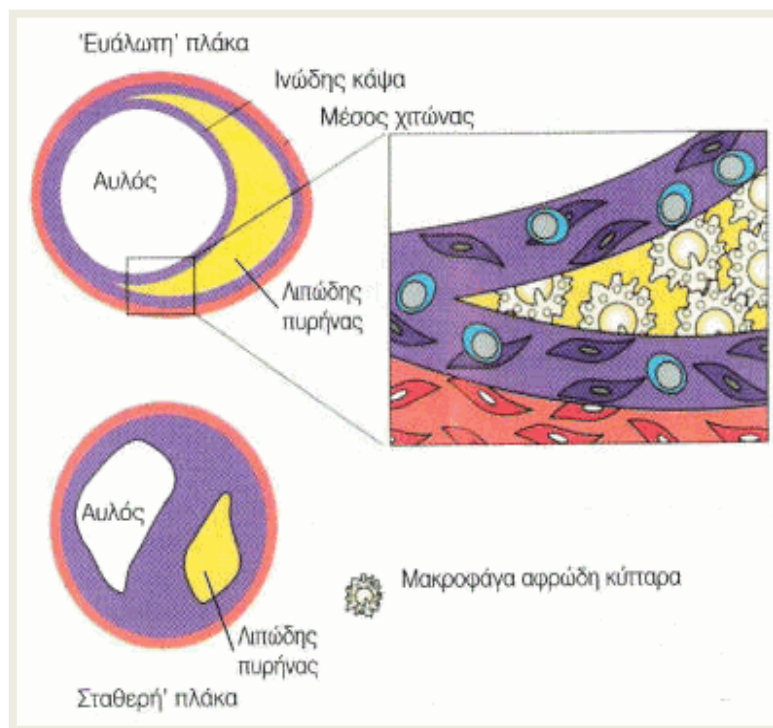
Η εξέταση και η διάγνωση του τύπου της αθηρωματικής πλάκας σε ένα ασθενή είναι ζωτικής σημασίας. Ανάλογα με τον τύπο της αθηρωματικής πλάκας, ακολουθείται η αντίστοιχη θεραπευτική ή χειρουργική προσέγγιση, ή απλή παρακολούθηση. Τα περισσότερα οξεία ισχαιμικά σύνδρομα είναι αποτέλεσμα ρήξης πλακών, επομένως η σωστή εκτίμηση της κατάστασης του ενδοθηλίου και των πλακών που έχουν σχηματιστεί οδηγεί στην επιτυχέστερη αντιμετώπιση.

7.2.3 ΣΤΑΘΕΡΗ VS ΑΣΤΑΘΗΣ ΠΛΑΚΑ

Σημαντική παρατήρηση, η οποία σχετίζεται με τον τύπο της αθηρωματικής πλάκας και αποτελεί προγνωστικό δείκτη ρήξης ή μη, είναι η σταθερότητα της πλάκας. Υπάρχουν δυο ειδών αθηρωματικές πλάκες, οι ασταθείς και οι σταθερές. Οι ασταθείς πλάκες είναι αυτές οι οποίες προκαλούν τα επείγοντα ισχαιμικά περιστατικά και ευθύνονται για το θάνατο των περισσότερων ανθρώπων που πάσχουν από αθηροσκλήρωση.

Μερικά από τα κριτήρια διαφοροποίησης των πλακών είναι το μέγεθος της πλάκας, η σοβαρότητα της στένωσης και η σύνθεσή της.

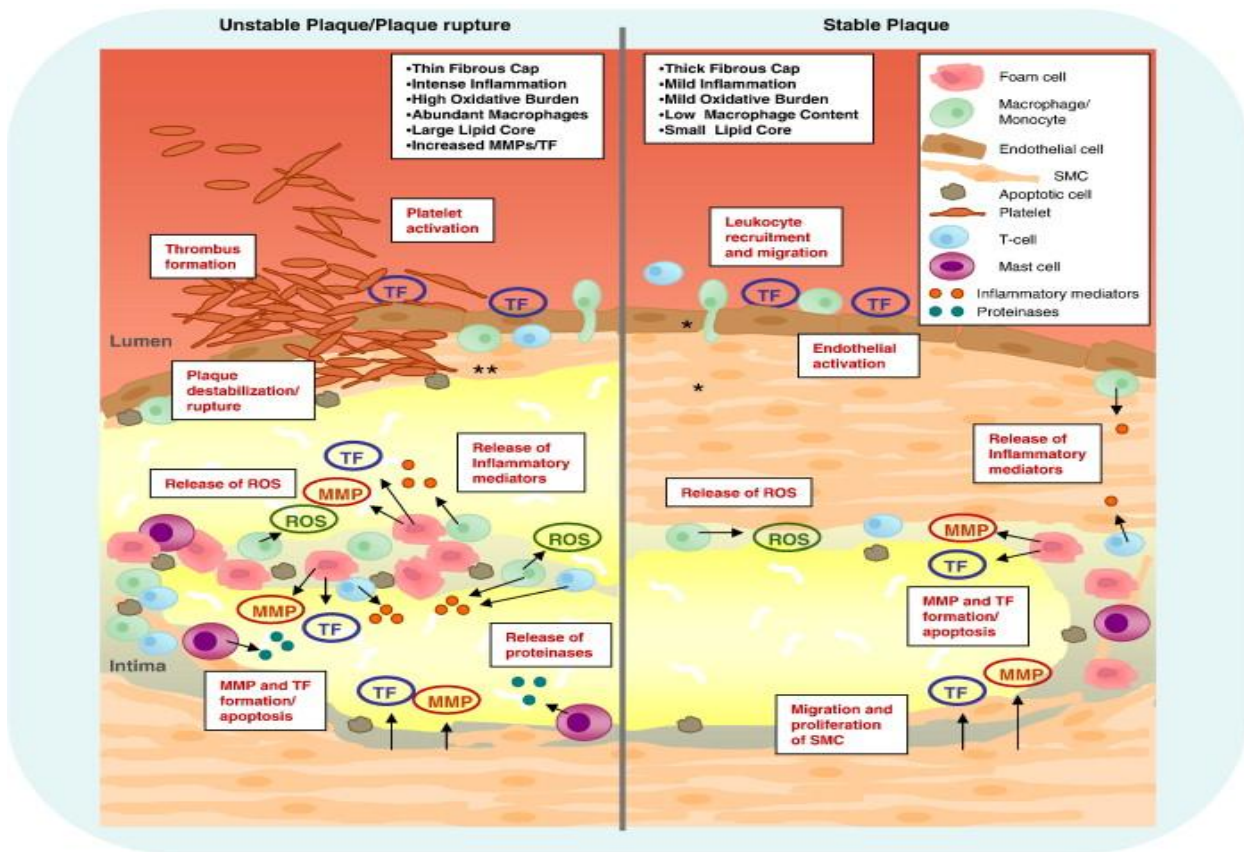
Μελέτες ανασκόπησης υπέδειξαν ότι τα δυο τρίτα των ασθενών που υπέστησαν οξεία ισχαιμικά επεισόδια, είχαν μερικές εβδομάδες προηγουμένως υποβληθεί σε στεφανιαία αγγειογραφία, η οποία έδειχνε τη βλάβη να έχει στένωση διαμέτρου όχι μεγαλύτερη από 70%.²⁷⁻²⁹ Επομένως οι



πλάκες που δεν προκαλούν περιορισμό της ροής λόγω στένωσης ευθύνονται για τις περισσότερες περιπτώσεις ρήξης της πλάκας και θρόμβωσης, σε σχέση με αυτές που προκαλούν μεγαλύτερο ποσοστό στένωσης του αγγείου. Επιπλέον μια μετα-ανάλυση έδειξε ότι το 70% των ασθενών που πέθαναν από καρδιαγγειακό νόσημα, είχαν αθηρωματικές βλάβες σε σημεία των στεφανιαίων αρτηριών, τα οποία ήταν ήπια στενωμένα.³⁰

Σχήμα 7.9. Εγκάρσια τομή ασταθούς και σταθερής αθηρωματικής πλάκας³¹

Η θετική αναδιαμόρφωση (positive remodeling) σε αντίθεση με την αρνητική αναδιαμόρφωση (negative remodeling) παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του μεγέθους του αυλού.



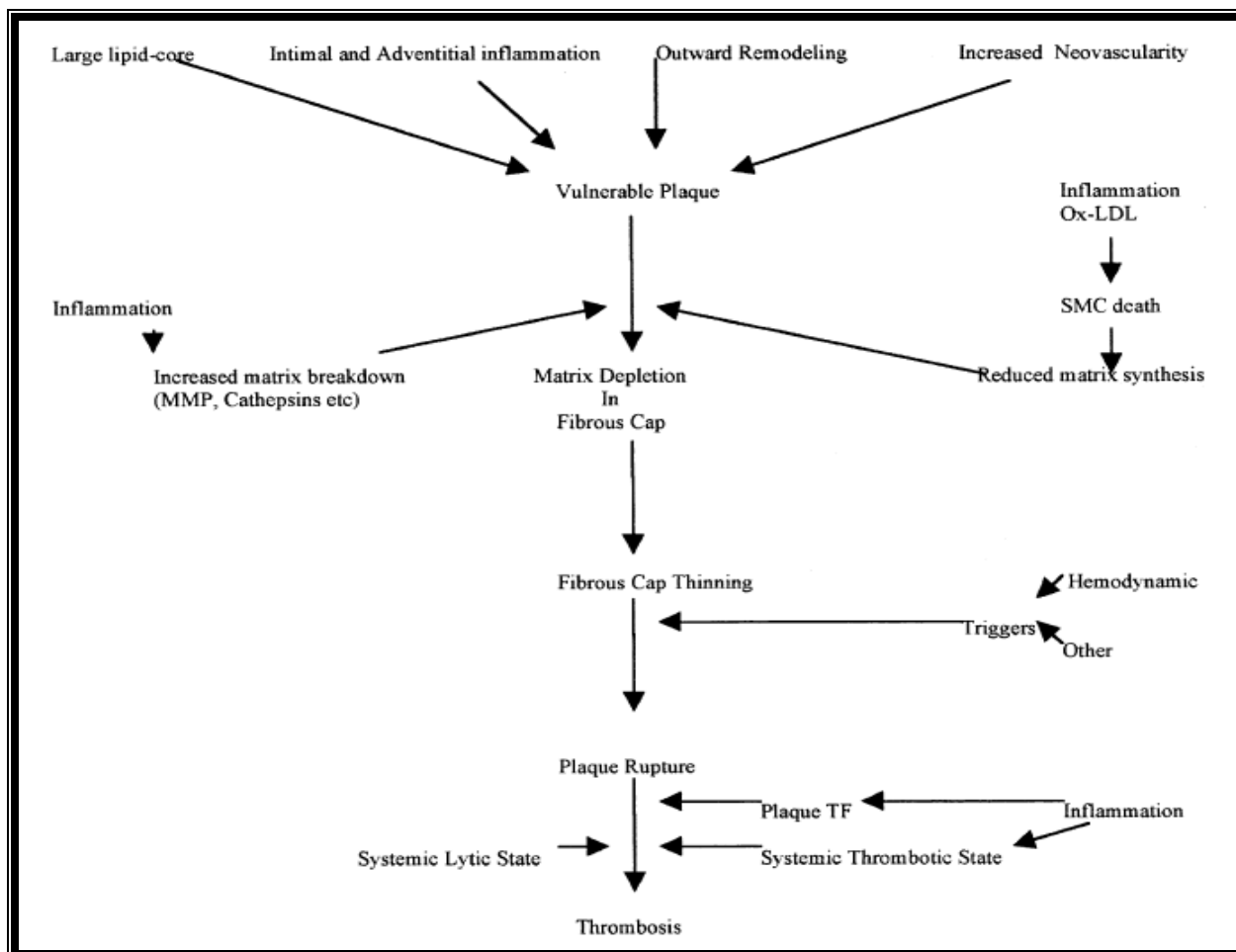
Σχήμα 7.10. Σχηματικά οι διαφορές ασταθούς και σταθερής αθηρωματικής πλάκας³²

Δηλαδή η μεγαλύτερη εξωτερική αναδιαμόρφωση μιας ασταθούς πλάκας μπορεί να μη μειώσει τη διάμετρο του αυλού παρά το μεγάλο μέγεθος της πλάκας. Τεχνολογικά μοντέλα χρησιμοποιώντας το νόμο Laplace έδειξαν ότι οι μεγαλύτεροι αυλοί (λόγω θετικής αναδιαμόρφωσης - positive outward remodeling) δημιουργούν μεγαλύτερες περιμετρικές πιέσεις στις ινώδεις κάψες, αυξάνοντας την πιθανότητα ρήξης, ενώ η αρνητική αναδιαμόρφωση που οδηγεί σε στενότερο αγγειακό αυλό σχετίζεται με τη σταθερή στηθάγχη.³³

Βέβαια, ο αριθμός των αυλών με μεγαλύτερη διάμετρο είναι πέντε με δέκα φορές μεγαλύτερος από αυτών με σημαντική στένωση. Επομένως παρατηρούνται στατιστικά περισσότερες ρήξεις πλακών και εμφάνιση θρόμβων.

Ιστολογικά, οι ασταθείς πλάκες φαίνεται ότι έχουν ένα λιπιδικό πυρήνα που καταλαμβάνει περισσότερο από το 40% του συνολικού όγκου της πλάκας, με αυξημένη διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων και χιτώνα, λεπτή κάψα αποτελούμενη από ελάχιστα λεία μυϊκά κύτταρα και αυξημένη αιμάτωση.^{28,33-35}

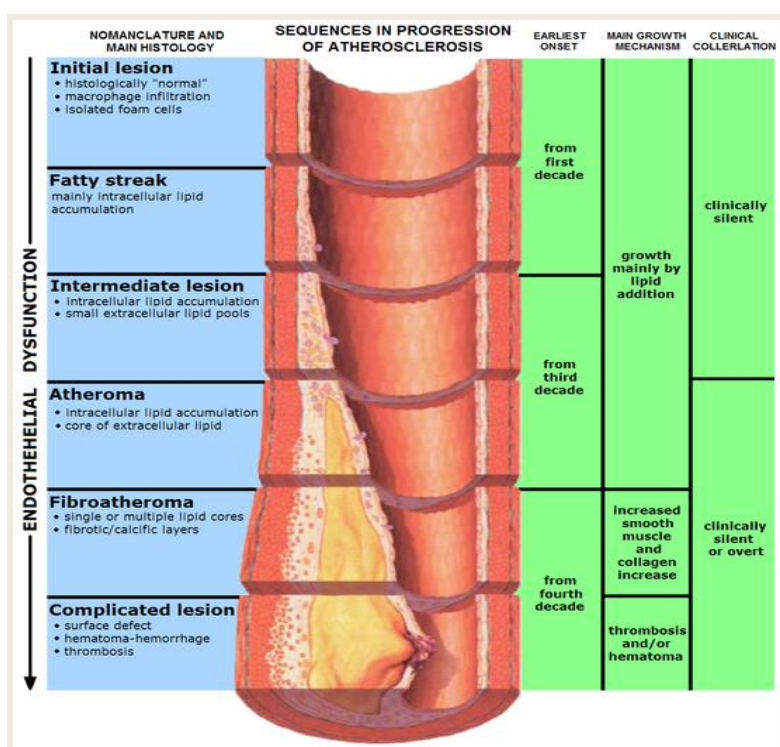
Ο εξωκυτταρικός λιπιδικός πυρήνας αποτελείται από χοληστερόλη και εστέρες που προήλθαν από λιπίδια που διήθησαν το αρτηριακό τοίχωμα και από λιπίδια που προήλθαν από το θάνατο των αφρωδών κυττάρων.



Σχήμα 7.11. Απεικόνιση πιθανών παθοφυσιολογικών μηχανισμών αστάθειας της αθηρωματικής πλάκας, της ρήξης και της θρόμβωσης, SMC: λεία μυϊκά κύτταρα, TF: ιστικός παράγοντας, MMP: μεταλλοπρωτεϊνάσες²⁸

Η σύνθεση της ασταθούς πλάκας συσχετίζεται και με τη ρήξη μιας πλάκας. Η διάρρηξη της συνέχειας του έσω χιτώνα διευκολύνεται από την παρουσία κυττάρων φλεγμονής, την απελευθέρωση τοξικών ουσιών και πρωτεολυτικών ενζύμων ικανά για αποδόμηση του κολλαγόνου (όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMPs, οι οποίες αποσταθεροποιούν περαιτέρω την πλάκα), τη δομική αδυναμία στην περιοχή της βλάβης και την αυξημένη διατμητική τάση.^{2,15} Οι ρωγμές απαντώνται συχνότερα εκεί που υπάρχει λεπτή ινώδης κάψα και μεγάλη συγκέντρωση αφρωδών κυττάρων.¹⁵

Με τη ρήξη της πλάκας απελευθερώνονται στο εσωτερικό του αυλού μακροφάγα και ιστικός παράγοντας. Ο ιστικός παράγοντας (tissue factor) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, μικρού μοριακού βάρους, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων και εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα, μετά από διάφορα ερεθίσματα, όπως από την ox-LDL.^{36,37} Ο ιστικός παράγοντας είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της πήξης, της αιμόστασης και της θρόμβωσης και είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής του καταρράκτη της πήξης.³⁸ Συνδέεται με τους πηκτικούς παράγοντες VII/VIIa και οδηγεί σε ενεργοποίηση των παραγόντων IX και X. Παράγεται επίσης θρομβίνη, ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια και γίνεται σχηματισμός ινώδους. Με αυτό το τρόπο σχηματίζονται θρόμβοι οι οποίοι είτε είναι αποφρακτικοί είτε όχι.³⁹⁻⁴¹



Επί ασυμπτωματικού θρόμβου, αυτός μπορεί να ενσωματωθεί στην αθηρωματική πλάκα. Οι εναποθέσεις αυτές σταδιακά συγκεντρώνουν μεγάλο αριθμό λείων μυϊκών κυττάρων, που προέρχονται από τον έσω χιτώνα και συνθέτουν κολλαγόνο. Τελικά ο θρόμβος υπερκαλύπτεται από ενδοθηλιακά κύτταρα. Μερικοί από αυτούς συνεχίζουν να μεγαλώνουν και αποφράσσουν το αγγείο μέσα σε λίγες ώρες ή μέρες.²

Σχήμα 7.12. Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης⁴²

Ωστόσο, ο σχηματισμός θρόμβων μπορεί να γίνει ανεξάρτητα από την ύπαρξη αιματώματος ή λύσης της συνέχειας μιας πλάκας. Μπορεί να οφείλεται στις μεταβολές της αιματικής ροής λόγω παραμορφώσεως της επιφάνειας του αυλού όπου βρίσκεται η πλάκα, λόγω διαμηθικών δυνάμεων στις εκφύσεις ή στους διχασμούς των αγγείων και λόγω συστηματικών παραγόντων όπως τα υψηλά επίπεδα ινωδογόνου, LDL, ομοκυστεΐνης κτλ.²

Συμπερασματικά, η σύνθεση της αθηρωματικής πλάκας αντί το μέγεθος της στένωσης του αυλού, φαίνεται ότι είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας της αστάθειάς της.¹⁵ Επομένως η δυνατότητα έγκαιρης ανίχνευσης της ευπάθειας μιας πλάκας μπορεί να έχει σημαντικές κλινικές επιπτώσεις.

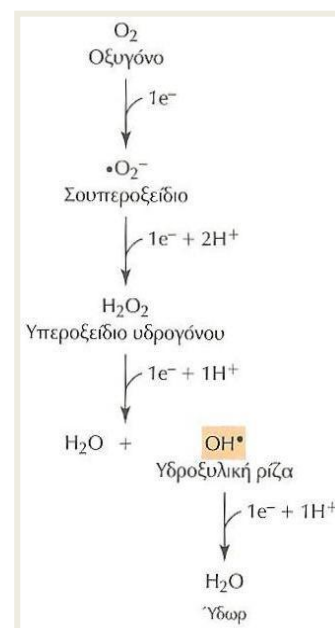
8. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

8.1 ΟΡΙΣΜΟΙ

Το οξειδωτικό στρες είναι μια ανισορροπία μεταξύ της συστηματικής εκδήλωσης των ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου (reactive oxygen species ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αποτοξινώσει τα δραστικά ενδιάμεσα ή να επισκευάσει την προκύπτουσα βλάβη.

Το οξυγόνο είναι σημαντικό για τη ζωή. Ενώ οι οξειδωτικές διαδικασίες στα κύτταρα γενικά καταλήγουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων προς το O₂ για να σχηματισθεί ύδωρ, χωρίς την απελευθέρωση ενδιάμεσων προϊόντων, ένας αριθμός ριζών οξυγόνου σχηματίζονται αναπόφευκτα.⁴³

Ελεύθερη ρίζα είναι ένα μόριο που διαθέτει ένα ιδιαίτερα δραστικό ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε εξωτερικό τροχιακό, το οποίο μπορεί να προκαλέσει την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων με την απόσπαση ενός μόνο ηλεκτρονίου από ένα άλλο μόριο, ώστε να συμπληρώσει το δικό του τροχιακό. Η σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων στο O₂ καταλήγει στο σχηματισμό των ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου (ROS), δηλαδή ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2$), στη συνέχεια υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και τελικά ελευθέρων ριζών υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου από μόνο του δεν είναι ελεύθερη ρίζα, αλλά μετατρέπεται με τις αντιδράσεις Fenton ή Haber-Weiss (Σχήμα 8.2) σε ρίζα υδροξυλίου.⁴³

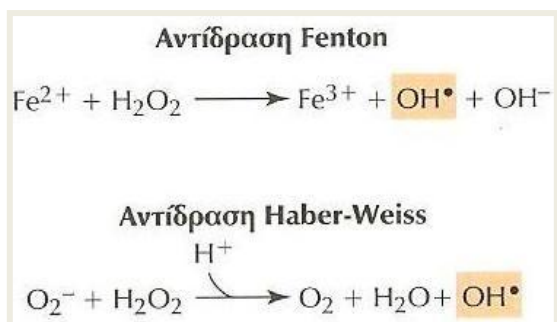


Σχήμα 8.1. Σχηματισμός ROS⁴³

Η κυριότερη ενδοκυττάρια πηγή ριζών οξυγόνου είναι η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Μπορούν επίσης να παραχθούν στα υπεροξειδισώματα, στο σύστημα του

κυτοχρώματος P450 και σε συγκεκριμένα κύτταρα (πχ. φαγοκύτταρα) κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονής. Άλλοι τρόποι παραγωγής τοξικών ριζών μπορεί να είναι η κοσμική ακτινοβολία, η κατάποση χημικών και φαρμάκων, καθώς και ο καπνός.⁴³

Αν και το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι ευεργετικό, καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα το χρησιμοποιεί για να αντιμετωπίζει παθογόνους μικροοργανισμούς και ουσίες, φαίνεται ότι



συμμετέχει στην εξέλιξη πολλών νοσημάτων όπως στον καρκίνο, στο Parkinson, στο Alzheimer, στην καρδιακή ανεπάρκεια, στο έμφραγμα του μυοκαρδίου, στη σχιζοφρένεια, στη διπολική διαταραχή, στη δρεπανοκυτταρική αναιμία και στην αθηροσκλήρωση.

Σχήμα 8.2. Οι αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss⁴³

8.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΑΠΟ ROS

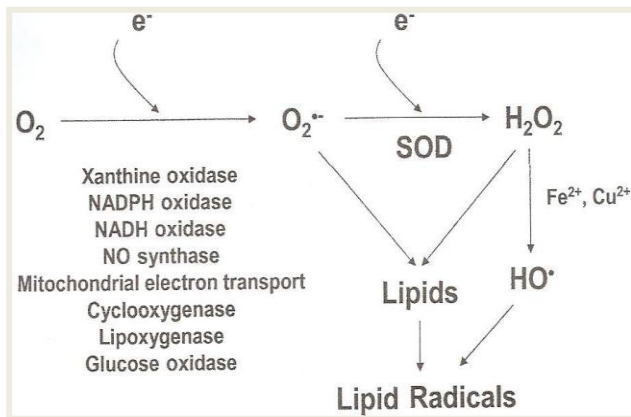
Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προκαλούν ποικίλες κυτταρικές βλάβες. Τα φωσφολιπίδια του πλάσματος και τα οργανίδια των μεμβρανών υφίστανται λιπιδική υπεροξειδωση.⁴⁴ Αυτή αφορά μια αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών, που ξεκινά με την απόσπαση υδρογόνου από ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, μέσω της επίδρασης μιας ρίζας υδροξυλίου. Στη συνέχεια με την προσθήκη O_2 σχηματίζονται λιπιδικές ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου και λιπιδικά υπεροξειδία μαζί με μηλονική διαλδεϋδη, η οποία ανιχνεύεται στο αίμα.⁴³

Μια σημαντική συνέπεια της υπεροξειδωσης των λιπιδίων είναι η αυξημένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, που οδηγεί σε εισροή ιόντων Ca^{2+} και άλλων ιόντων με επακόλουθη διόγκωση του κυττάρου.⁴³ Στα μιτοχόνδρια η συσσώρευση ιόντων μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση. Σε άλλα κύτταρα τέτοιες μεταβολές μπορεί να οδηγήσουν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

Επίσης οι ρίζες οξυγόνου μπορούν να στοχοποιήσουν αμινοξέα και να μετουσιώσουν πρωτεΐνες. Η πιο σημαντική επίπτωση των ROS, είναι η πρόκληση βλαβών στο μιτοχονδριακό και πυρηνικό DNA που οδηγεί σε μεταλλάξεις.⁴³

κυττάρων και μετανάστευσης, στην απόπτωση, στην οξειδωση των λιπιδίων, στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών και στην τροποποίηση της αγγειοκινητικής δραστηριότητας.⁴⁵

Μεγάλο ενδιαφέρον έχουν οι πηγές οι οποίες συμβάλλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου στον αγγειακό ιστό. Τα κυριότερα ενζυμικά συστήματα που παράγουν ROS είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) οξειδάση, μιτοχονδριακά ένζυμα, η συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS – nitric oxide synthase) και άλλες λιγότερο σημαντικές πηγές.^{45,46} Τα ένζυμα αυτά έχουν διάφορα υποστρώματα ως πηγές ηλεκτρονίων, τα οποία υπό συγκεκριμένες συνθήκες μετατρέπουν το μοριακό οξυγόνο σε ενεργά ενδιάμεσα οξυγόνου.



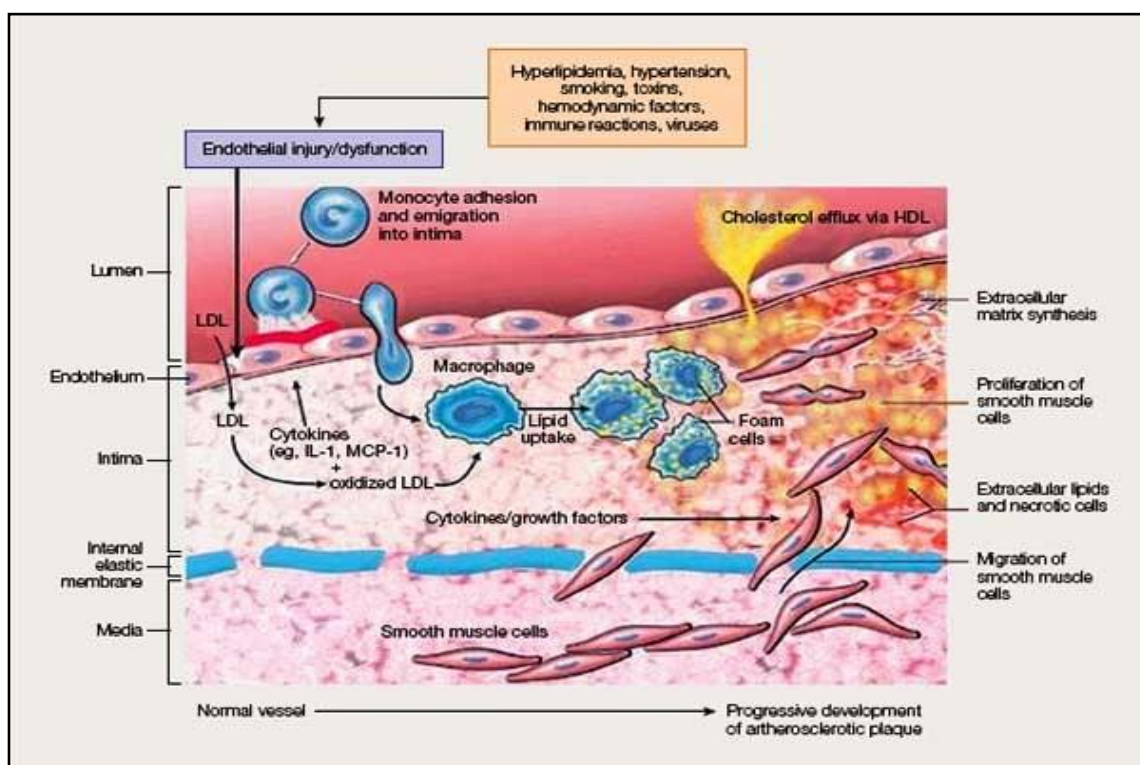
Δύο από τους βασικούς μηχανισμούς με τους οποίους αυτά τα ενζυμικά συστήματα εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση είναι η οξείδωση της LDL και η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO.

Σχήμα 8.4. Δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου. SOD:superoxide dismutase²

8.3.1 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ LDL

Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις καρδιαγγειακών συμβαμάτων έχει ενοχοποιηθεί η LDL χοληστερόλη. Ωστόσο η αρχική της μορφή δεν θεωρείται αθηρογενής, αλλά η οξειδωμένη μορφή της. Σχεδόν όλα τα σημαντικά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος μπορούν να οξειδώσουν την LDL χοληστερόλη. Σε αρχική φάση, οξειδώνεται ήπια στον υπενδοθηλιακό χώρο σε MM-LDL (minimally modified LDL).⁴⁶

Η MM-LDL έχει λίγο διαφορετική σύνθεση από τη βαριά οξειδωμένη LDL, ωστόσο είναι ικανή να διεγείρει την παραγωγή της πρωτεΐνης MCP-1, η οποία προωθεί την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα. Επίσης διεγείρει και την παραγωγή του παράγοντα M-CSF, ο οποίος προωθεί τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων σε μακροφάγα. Επομένως μια ήπια οξειδωμένη LDL καταφέρνει να ξεκινήσει μια φλεγμονώδη απάντηση που συμβάλλει στη δημιουργία βλαβών.



Σχήμα 8.5. Σχηματικά απεικονίζονται οι δράσεις της ox-LDL⁴⁷

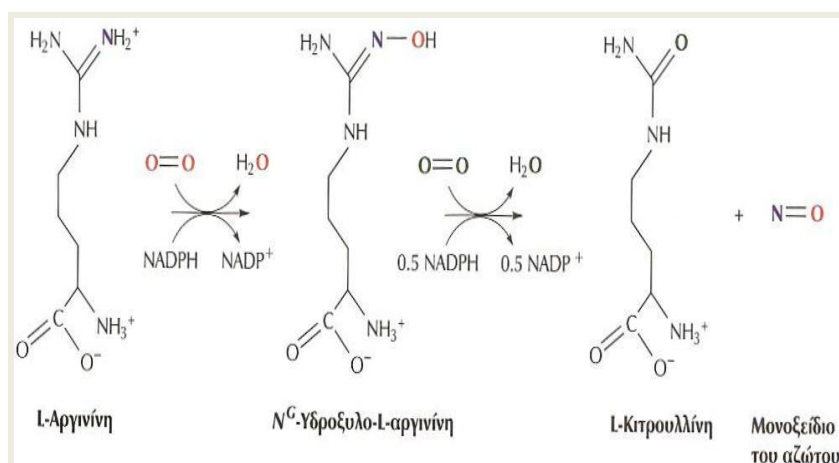
Η MM-LDL οξειδώνεται περαιτέρω στην ox-LDL, η οποία πλέον δεν αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς LDL, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τον καταβολισμό της. Τότε η ox-LDL αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς της τροποποιημένης LDL χωρίς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα μακροφάγα να προσλαμβάνουν ανεξέλεγκτα χοληστερόλη, να μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, να θανατώνονται και να εναποτίθενται στις αθηρωματικές πλάκες.

Η ox-LDL έχει αρκετές βιολογικές δράσεις. Δρα ως προ-φλεγμονώδης παράγοντας, προκαλεί αναστολή της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO, προωθεί την αγγειοσύσπαση, ενεργοποιεί κυτταροκίνες όπως την ιντερλευκίνη-1 και αυξάνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.⁴⁶

Επίσης έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης (vascular endothelial growth factor - VEGF) στα μακροφάγα καθώς και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα προϊόντα της οξειδωμένης LDL είναι κυτταροτοξικά και μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση. Έχει την ικανότητα να κατακρατά τα μακροφάγα αναστέλλοντας την κινητικότητά τους. Τέλος μπορεί να διεγείρει τον ιστικό παράγοντα και να τροποποιήσει τη διαδικασία πήξης.^{45,46}

8.3.2 ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO)

Το μονοξείδιο του αζώτου είναι ένα αέριο μόριο σηματοδότησης ζωτικής σημασίας. Είναι πολύ δραστικό μόριο, με χρόνο ημιζωής λίγων δευτερολέπτων, και διαχέεται εύκολα κατά μήκος των μεμβρανών.⁴⁸ Αυτές οι ιδιότητες το καθιστούν ιδανικό σηματοδοτικό μόριο για παρακρινείς και αυτοκρινείς διαδικασίες. Επιτελεί σημαντικές λειτουργίες όπως χαλάρωση του λείου αγγειακού μυός, αναστέλλει τη συσσώρευση και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, την προσκόλληση



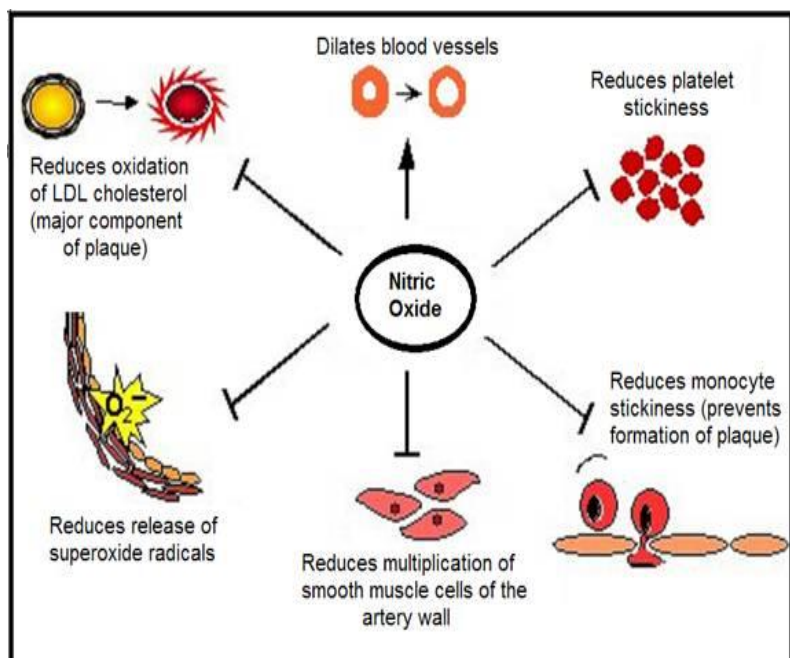
των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο και έχει αγγειοδιασταλτικές και αντι-αθηρογενείς ιδιότητες. Επομένως ρυθμίζει την ροή του αίματος, την αγγειακή διαπερατότητα και συμβάλλει στην αγγειακή ομοιόσταση.⁴⁹

Σχήμα 8.6. Παραγωγή NO⁴²

8.3.2.1 ΣΥΝΘΕΤΑΣΕΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NOS)

Το NO σχηματίζεται κατά τη μετατροπή του αμινοξέος L-αργινίνη σε L-κιτρουλλίνη μέσω ειδικών ενδοθηλιακών ενζύμων που ονομάζονται συνθετάσες του NO (nitric oxide synthase - NOS).

Οι συνθετάσες του NO είναι ένζυμα που περιέχουν αίμη και φλαβίνη και καταλύουν τη σύνθεση NO μέσω δυο, εν σειρά αντιδράσεων μονοξυγονασών. Είναι λειτουργικά διμερή και αποτελούνται από δυο περιοχές, μια περιοχή οξυγενάσης που περιέχει αίμη και μια περιοχή αναγωγάσης που περιέχει φλαβίνη. Ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADPH, μέσω των φλαβινών FAD και FMN, στον αιμικό σίδηρο όπου το οξυγόνο είναι δεσμευμένο και ενεργοποιημένο. Οι περιοχές συνδέονται μέσω μιας θέσης πρόσδεσης καλμοδουλίνης, η



κατάληψη της οποίας είναι απαραίτητη για την ηλεκτρονική μεταφορά από την περιοχή αναγωγάσης στην περιοχή οξυγενάσης. Επίσης οι περιοχές οξυγενάσης των NOS περιέχουν μια θέση πρόσδεσης για τετραϋδροβιοπτερίνη (H₄B), η οποία προφανώς συμμετέχει στην ηλεκτρονική μεταφορά και είναι σημαντική για την δομική και λειτουργική ακεραιότητα του ενζύμου.⁵⁰

Σχήμα 8.7. Βιολογικές επιδράσεις του NO⁴¹

Η γενική αντίδραση που καταλύεται από τις NOS είναι όπως αναφέρθηκε, η μονοξυγόνωση του αμινοξέος L-αργινίνη για το σχηματισμό NO και κιτρουλίνης. Η αντίδραση ξεκινά με την πρόσδεση της καλμοδουλίνης για να «ανοίξει η πύλη» μεταξύ των περιοχών αναγωγάσης και οξυγενάσης. Ο δότης ηλεκτρονίων είναι το NADPH που δίνει δυο ηλεκτρόνια στο FAD (flavine adenine nucleotide), το οποίο στη συνέχεια ανάγει το FMN (flavine mononucleotide). Το FMN ανάγει το σίδηρο στον οποίο έπειτα μπορεί να συνδεθεί το οξυγόνο. Η πηγή NO είναι η γουανιδινομάδα του υποστρώματος αργινίνης. Το ρυθμιστικό βήμα για την ενεργοποίηση των NOS είναι η πρόσδεση καλμοδουλίνης η οποία υποβοηθάται από μια εισροή ασβεστίου. Απουσία του συμπλόκου ασβεστίου-καλμοδουλίνης όλες οι διεργασίες γίνονται με αργό ρυθμό και δεν παράγεται NO.⁵⁰

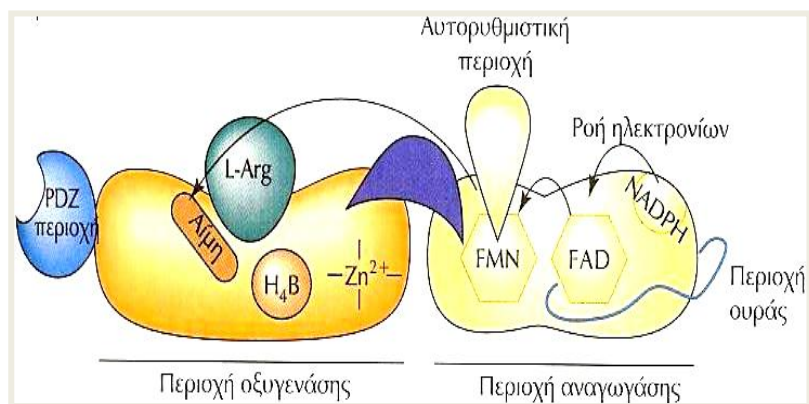
Μια ακόμη ιδιαιτερότητα των NOS είναι ότι δεν απαιτείται η πρόσδεση του υποστρώματος για την έναρξη του κύκλου αντίδρασης. Επομένως εάν δεν υπάρχει υπόστρωμα, αλλά το NOS είναι ενεργό, μπορεί να σχηματιστούν δυνητικά καταστροφικές μορφές οξυγόνου, οι οποίες ενοχοποιούνται για διάφορα νοσήματα.⁵⁰

8.3.2.2 ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ NOS ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Υπάρχουν τρεις κύριες ισομορφές NOS, η νευρωνική (neuronal NOS – nNOS – NOSI), η επαγωγίμη (inducible NOS – iNOS – NOSII) και η ενδοθηλιακή (endothelial NOS – eNOS – NOSIII).

Η nNOS απαντάται κυρίως σε σκελετικούς μυς και σε νευρώνες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Το παραγόμενο NO, από αυτό το ένζυμο εμπλέκεται στην κινητικότητα του εντέρου και στον έλεγχο του πυλωρικού σφιγκτήρα, διαμεσολαβεί στην κύρια βρογχοδιασταλτική οδό του πνευμονικού συστήματος και εμπλέκεται στο νευρικό έλεγχο του αγγειακού συστήματος. Επίσης συμμετέχει στον έλεγχο της ουρήθρας, της κύστης και στη στύση.⁵⁰

Η iNOS απαντάται πρωταρχικά σε ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μακροφάγα, αστροκύτταρα και ηπατοκύτταρα και συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση. Το NO που παράγεται από την iNOS είναι μια δυνητικά κυτταροτοξίνη, η οποία καταστρέφει παθογόνα που εγκολπώνονται από ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Επίσης ελέγχει ενδοκυττάρια παθογόνα παράσιτα όπως το πλασμώδιο, το σχιστόσωμα, τη λεισμάνια, το τοξόπλασμα, τα μυκοβακτήρια και τους μύκητες. Μονοξείδιο του αζώτου παράγεται και κατά τη διάρκεια χρόνιας φλεγμονής.

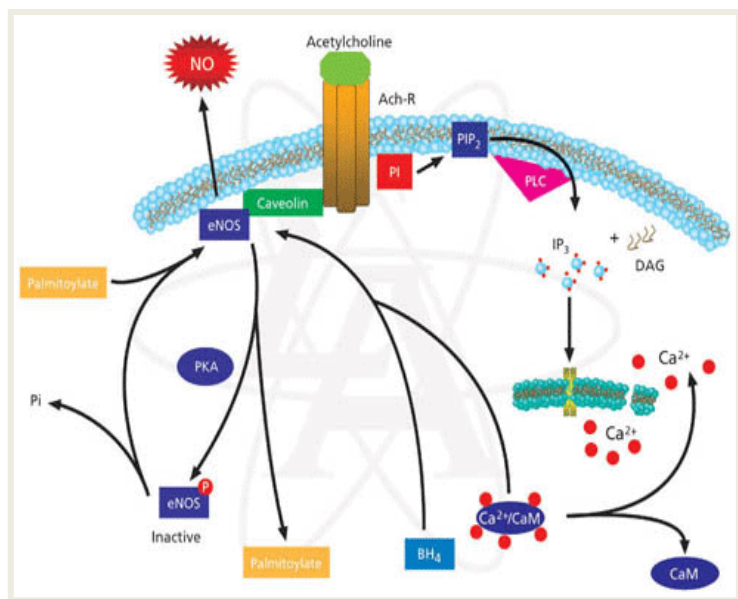


Το NO είναι απαραίτητο για την αντιμικροβιακή λειτουργία των μακροφάγων, αλλά η υπερπαραγωγή NO από την iNOS έχει ενοχοποιηθεί στο σηπτικό, επαγόμενο από κυτταροκίνες, κυκλοφορικό σοκ. Στην περίπτωση αυτή η

Σχήμα 8.8. Δομή μιας συνθάσης που εκθέτει τις σχετικές θέσεις των προσθετικών ομάδων και συμπαραγόντων⁴²

υπερβολική ποσότητα NO οδηγεί σε μαζική συστηματική αγγειοδιαστολή και μια απότομη και ορισμένες φορές θανατηφόρα πτώση της πίεσης του αίματος με επακόλουθη δυσλειτουργία πολλών οργάνων.⁵⁰

Η eNOS εκφράζεται κυρίως σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και σε καρδιακά μυοκύτταρα. Το NO που παράγεται εξυπηρετεί ως αγγειοδιαστολέας αγγειακού λείου μυός και έχει αντι-θρομβωτικές και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις. Η σύνθεσή του ενεργοποιείται μετά από πρόσδεση υποκαταστατών όπως της βραδυκινίνης, ακετυλοχολίνης, ινσουλίνης, ύστερα από διαμητική τάση, ή μηχανική δύναμη ροής του αίματος στην αυλική επιφάνεια του αγγειακού ενδοθηλίου.⁵¹ Το NO διαχέεται εκτός του ενδοθηλιακού κυττάρου σε γειτονικά λεία μυϊκά κύτταρα όπου προσδένεται και ενεργοποιεί τη γουανυλική κυκλάση, η οποία συνθέτει κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cyclic guanosine monophosphate-cGMP). Το cGMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση G, η οποία φωσφορυλιώνει μια σειρά διαύλων (κυρίως mKATP) που οδηγούν σε αναστολή εισροής ασβεστίου στο λείο μυϊκό κύτταρο. Η αγγειοσυστολή σε αγγειακό λείο μυ απαιτεί την εισροή ασβεστίου, που δεσμεύεται σε καλμοδουλίνη, η οποία ενεργοποιεί τη μυϊκή κινάση ελαφράς αλυσίδας (muscle light chain kinase – MLCK). Η MLCK στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την ελαφρά αλυσίδα μυοσίνης (myosine light chain – MLC), με αποτέλεσμα τη συστολή. Η αναστολή επομένως εισροής ασβεστίου από την πρωτεϊνική κινάση G, οδηγεί σε μειωμένη διέγερση της MLCK και μειωμένη φωσφορυλίωση της MLC, προκαλώντας αγγειοδιαστολή. Το αυξημένο cGMP επίσης προκαλεί άμεσα αποφωσφορυλίωση



Σχήμα 8.9. Σχηματική αναπαράσταση δράσης eNOS⁴³

της MLC. Υπάρχουν επιπλέον κάποιες πρωτεΐνες, οι καβεολίνες (caveolins), οι οποίες είναι προσδεμένες στην NOS και εξυπηρετούν την οργάνωση και σύνδεση σηματοδοτικών μορίων στις πλασματικές μεμβράνες. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις κυτταροπλασματικού ασβεστίου η caveolin προσδένεται και αναστέλλει την eNOS διατηρώντας την σε ανενεργή κατάσταση. Κατά την εισροή ασβεστίου, η

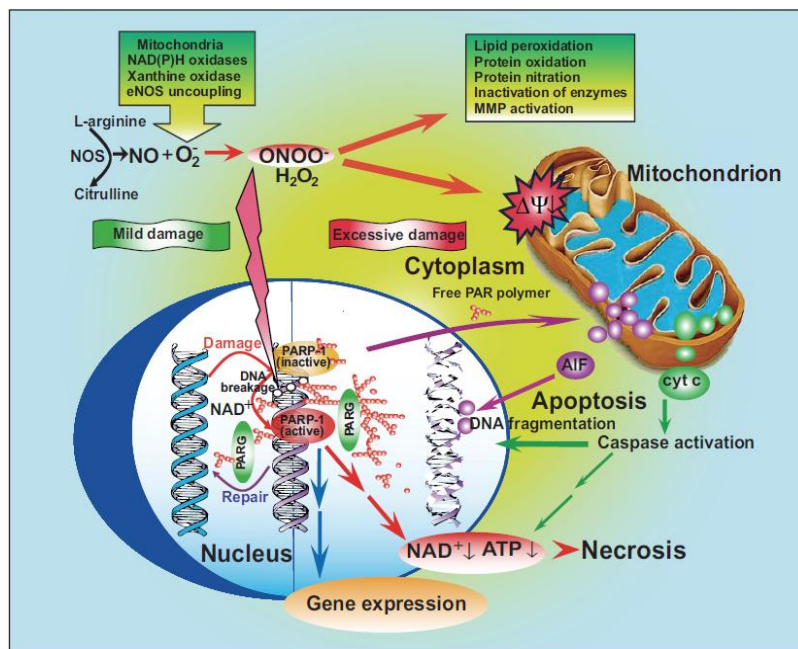
καλμοδουλίνη εκτοπίζει ανταγωνιστικά την caveolin, ενεργοποιώντας την eNOS.⁵⁰

Οι επιπτώσεις του NO όπως φαίνεται από τις παραπάνω παρατηρήσεις μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε βλαβερές. Επομένως, η ουσιαστική δράση του παραγόμενου NO εξαρτάται από το που παράγεται αυτό, τη ρύθμιση της παραγωγής του, πόσο παράγεται και ποια άλλα δραστικά είδη είναι παρόντα.

8.3.2.3 ΕΝΕΡΓΑ ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ ΑΖΩΤΟΥ (RNS)

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά ενός δυσλειτουργικού ενδοθηλίου είναι η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO. Αυτό μπορεί να επέλθει ως αποτέλεσμα μειωμένης σύνθεσης του NO ή αυξημένης απενεργοποίησής του λόγω παρουσίας ROS.

Η μειωμένη σύνθεση του NO μπορεί να οφείλεται είτε σε μειωμένη έκφραση της eNOS, είτε σε έλλειψη των συμπαραγόντων για την ενεργοποίηση της eNOS, είτε σε απενεργοποίησή της. Εάν υπάρχει έλλειψη της H₄B ή της αργινίνης, τότε τα ηλεκτρόνια από την ομάδα της αίμης μετατρέπουν το οξυγόνο σε ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου (enzyme uncoupling).⁴⁵ Η ρίζα ανιόντος

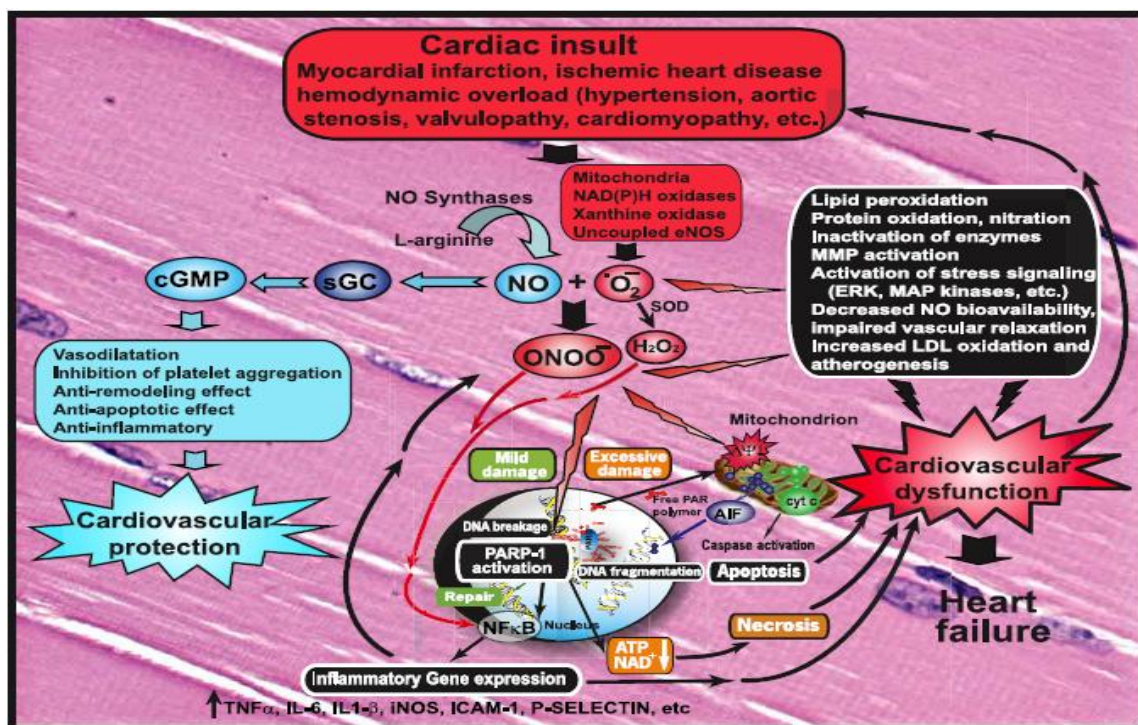


υπεροξειδίου αντιδρά με το NO και δημιουργεί το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO⁻). Αυτή η αντίδραση καταναλώνει το διαθέσιμο NO και η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι τρεις φορές ταχύτερη από τον καταβολισμό της ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου (υπεροξειδική δεσμουτάση - superoxide dismutase, SOD).

Σχήμα 8.10. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος⁴⁴

Η δημιουργία υπεροξυνιτρώδους ανιόντος οδηγεί στο σχηματισμό ενεργών ενδιάμεσων αζώτου (reactive nitrogen species – RNS). Το ONOO⁻ αντιδρά με διάφορα μόρια με δυο κύριους

μηχανισμούς. Πρώτον, το υπεροξυνιτρώδες και η πρωτονιομένη του μορφή μπορεί να οξειδώσει απευθείας ένα μόριο, με οξείδωση ενός ή δυο ηλεκτρονίων. Αυτό συνήθως γίνεται με πρωτεΐνες που έχουν θειόλες, κέντρα σιδήρου/θείου και περιοχές ψευδαργύρου. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά την έμμεση οξείδωση μορίων από το ONOO^- , αφού μετατραπεί σε πιο δραστικές μορφές όπως στη ρίζα του διοξειδίου του αζώτου ($\cdot\text{NO}_2$).^{52,53}

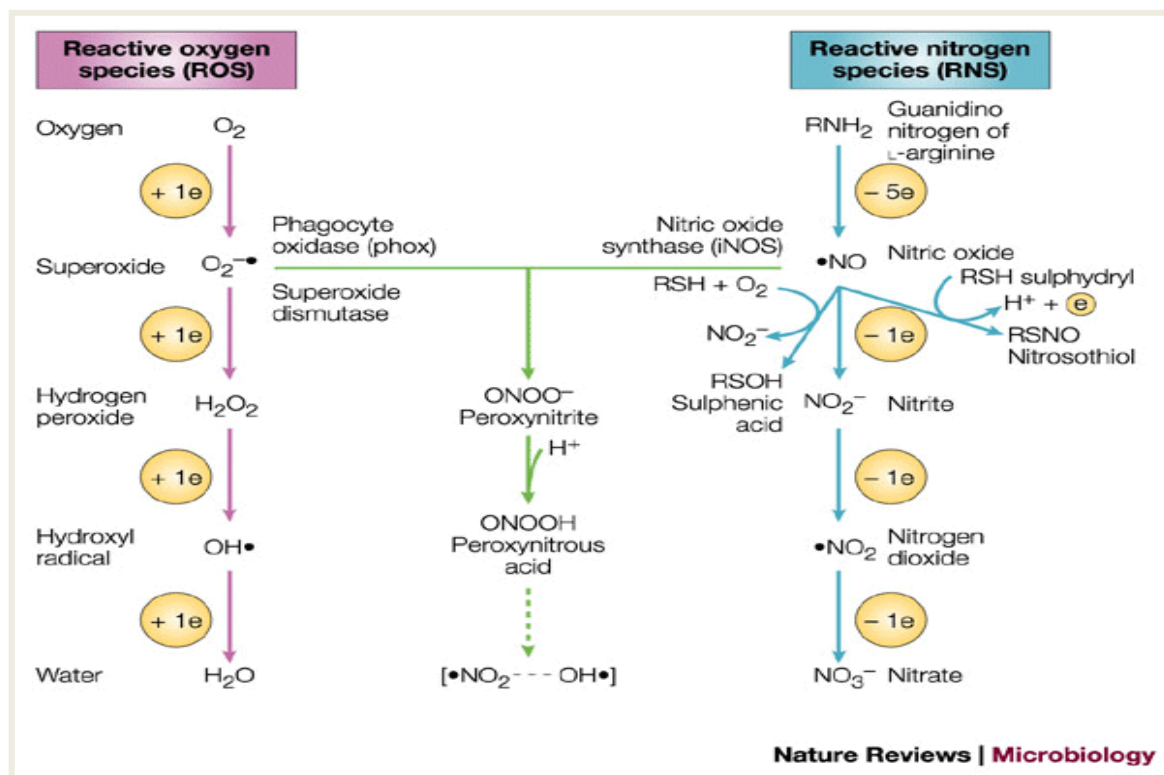


Εικόνα 8.11. Γενικό σχήμα που απεικονίζει τις επιπτώσεις από το υπεροξυνιτρώδες ανιόν στο καρδιαγγειακό σύστημα⁴⁴

Τα RNS αντιδρούν και με αμινοξέα πρωτεϊνών από τα οποία η αντίδραση με την τυροσίνη είναι η πιο σημαντική. Η νίτρωση της τυροσίνης επέρχεται με την προσθήκη μιας ομάδας NO_2 στην υδροξυλική ομάδα του αρωματικού της δακτυλίου. Αυτή η αλλαγή επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης, εμποδίζει τη μεταγωγή σημάτων η οποία στηρίζεται στη φωσφορυλίωση της τυροσίνης, προωθεί τη διαδικασία της απόπτωσης (μέσω αντίδρασης με μιτοχόνδρια) και συμβάλλει γενικά στην κυτταροτοξικότητα από το υπεροξυνιτρώδες ανιόν.⁵³

Επίσης το ONOO^- προκαλεί λιπιδική υπεροξειδωση στις μεμβράνες, στα λιποσώματα και στις λιποπρωτεΐνες αφαιρώντας ένα άτομο υδρογόνου από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids - PUFAs). Ειδικά μπορεί να μετατρέψει την LDL χοληστερόλη στην

οξειδωμένη μορφή της προωθώντας τη συσσώρευσή της και οδηγώντας στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων.^{53,54}

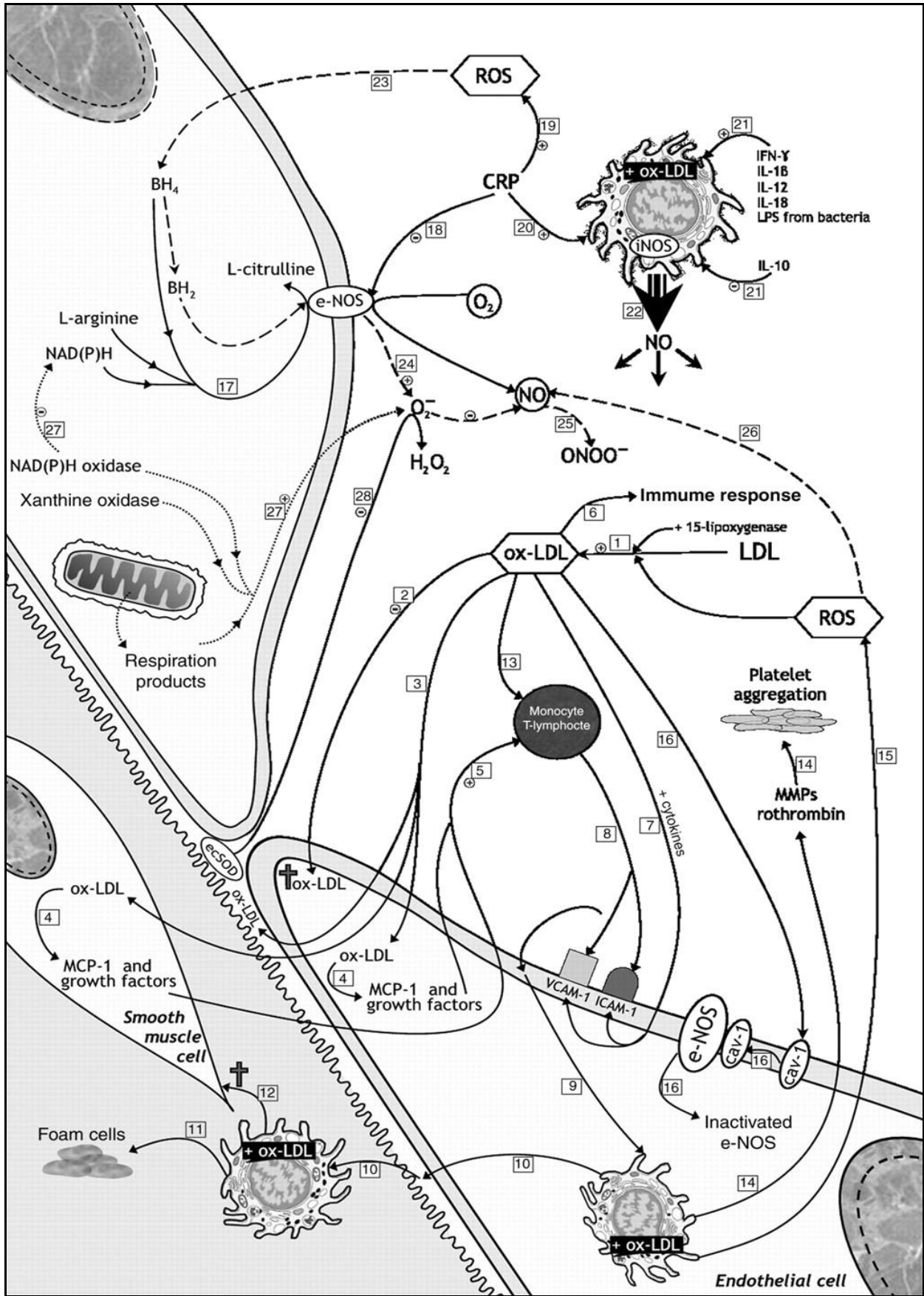


Σχήμα 8.12. Σχηματισμός ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου και αζώτου⁴⁵

Επιπλέον μπορεί να οξειδώσει την τετραϋδροβιοπτερίνη (H_4B), που είναι βασικός παράγοντας της συνθετάσης μονοξειδίου, και να προκαλέσει την αποσύζευξη του ενζύμου (uncoupling), όπως αναφέρθηκε παραπάνω.⁵⁴

8.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Τα κύτταρα έχουν πολλαπλούς τρόπους για να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή αζώτου και να προστατευθούν από τη βλαβερή δράση τους. Η υπεροξειδική δεσμουτάση καταλύει τη μετατροπή της ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο απομακρύνεται από την καταλάση. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή τόσο του υπεροξειδίου του υδρογόνου, όσο και των λιπιδικών υπεροξειδίων. Αναγεννά τη σουλφυδρυλική μορφή της γλουταθειόνης, χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων το NADPH.⁴³



Σχήμα 8.13. Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης σε 28 βήματα. **1:** Οξείδωση LDL από ROS **2:** ox-LDL είναι τοξικές για τα ECs **3:** Συσσώρευση των ox-LDL **4:** Αντίδραση μονοκυττάρων με τα ECs και SMCs **5:** Διέγερση μονοκυττάρων και T-λεμφοκυττάρων από MCP-1 **6:** Ανοσολογική αντίδραση από ox-LDL **7:** Έκφραση VCAM-1, ICAM-1 **8:** Δέσμευση λευκοκυττάρων και μονοκυττάρων **9,10:** Μετανάστευση μακροφάγων **11:** Δημιουργία αφρωδών κυττάρων **12:** Τοξικά για SMCs **13:** Ενεργοποίηση μακροφάγων **14:** Ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν μεταλλοπρωτεϊνάσες και προθρομβίνη που διεγείρουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων **15:** Συμβολή μακροφάγων και αφρωδών κυττάρων στην παραγωγή ROS **16:** ox-LDL επάγει τη ρύθμιση της caveolin και το σύμπλοκο caveolin και eNOS, αδρανοποιεί την eNOS **17:** Παραγωγή NO **18,19:** C αντιδρώσα πρωτεΐνη απορυθμίζει την eNOS και αυξάνει την παραγωγή ROS **20:** Επίσης διεγείρει την παραγωγή iNOS **21:** Ενεργοποίηση iNOS και από αλλού **22:** Μαζική παραγωγή NO **23:** Οξείδωση BH4 από ROS **24:** Παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος **25:** Αντίδραση με NO και δημιουργία ONOO⁻ **26:** Αντίδραση και με ROS για περαιτέρω παραγωγή ONOO⁻ **27:** NADPH, XO και μιτοχονδριακά προϊόντα επίσης συμβάλλουν στην παραγωγή ONOO⁻ **28:** SOD έχει προστατευτικό ρόλο ECs: endothelial cells, SMCs: smooth muscle cells, SOD: superoxide dismutase

Με βάση την παραπάνω γνώση τα τελευταία είκοσι χρόνια έχουν γίνει πολλές κλινικές δοκιμές με αντιοξειδωτικές ουσίες όπως για παράδειγμα βιταμίνες για τις ευεργετικές επιδράσεις τους στο ενδοθήλιο, τη μείωση των φλεγμονωδών ουσιών και τη βελτίωση της στεφανιαίας νόσου.

Η μελέτη CHAOS (Cambridge Heart Antioxidant Study) έδειξε ότι η χορήγηση 400IU ή 800IU α-τοκοφερόλης την ημέρα σε καρδιαγγειακούς ασθενείς, μείωσε δραματικά τη πιθανότητα θανατηφόρου καρδιαγγειακού επεισοδίου.⁵⁵ Σε μια άλλη μελέτη, την SPACE (Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular disease), η χορήγηση 800IU/d βιταμίνης E σε ασθενείς που έκανα αιμοκάθαρση με προϋπάρχουσα καρδιαγγειακή νόσο, παρατηρήθηκε μείωση της πιθανότητας θανατηφόρου εμφράγματος, εγκεφαλικού επεισοδίου, περιφερικής αγγειακής νόσου και ασταθούς στηθάγχης.⁵⁶ Μια έρευνα που αφορούσε την αθηροσκλήρωση που σχετιζόταν με μεταμόσχευση, σε μικρό αριθμό δείγματος, αποκάλυψε την αναστολή της εξέλιξης της αθηρωματικής πλάκας με τη χορήγηση 800IU/d βιταμίνης E και 1000mg/d ασκορβικού οξέος.⁵⁷ Επιπλέον, στη μελέτη ASAP (Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention), ο συνδυασμός βιταμίνης E 272IU/d και C 500mg/d μείωσε σημαντικά το πάχος του μέσου καρωτιδικού χιτώνα σε υπερχοληστερολαιμικούς άνδρες ασθενείς.⁵⁸ Μια έρευνα πάνω σε γυναίκες, στη μελέτη της Νοσοκομειακής Υγείας, η οποία διήρκησε 16 χρόνια, έδειξε σημαντική μείωση σε θανατηφόρα ή μη εμφράγματα του μυοκαρδίου, έπειτα από λήψη διατροφικών συμπληρωμάτων που περιείχαν πάνω από 359mg/d βιταμίνης C.⁵⁹ Παρά τις σημαντικές παρατηρήσεις των παραπάνω μελετών, υπήρχαν ακόμα

περισσότερες μελέτες οι οποίες δεν έδειξαν καμία ευεργετική δράση των βιταμινών. Μερικές από αυτές παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.^{55,60-64}

Κλινικές μελέτες με vitamin E			
	n	Ασθενείς	Αποτελέσματα
Πρωτογενής πρόληψη:			
ATBC	27200	καπνιστές	Θάνατος οφειλόμενος σε CAD -8%, n.s.
PPP	4500	1 παράγοντας κινδύνου	Χωρίς αποτέλεσμα
Δευτερογενής πρόληψη:			
CHAOS	2000	CAD	MI = θνησιμότητα
GISSI-Prev.	11300	Μετα-MI	Χωρίς αποτέλεσμα
HOPE	9500	CV ή διαβήτης	Χωρίς αποτέλεσμα
HPS	20500	CV ή διαβήτης	Χωρίς αποτέλεσμα

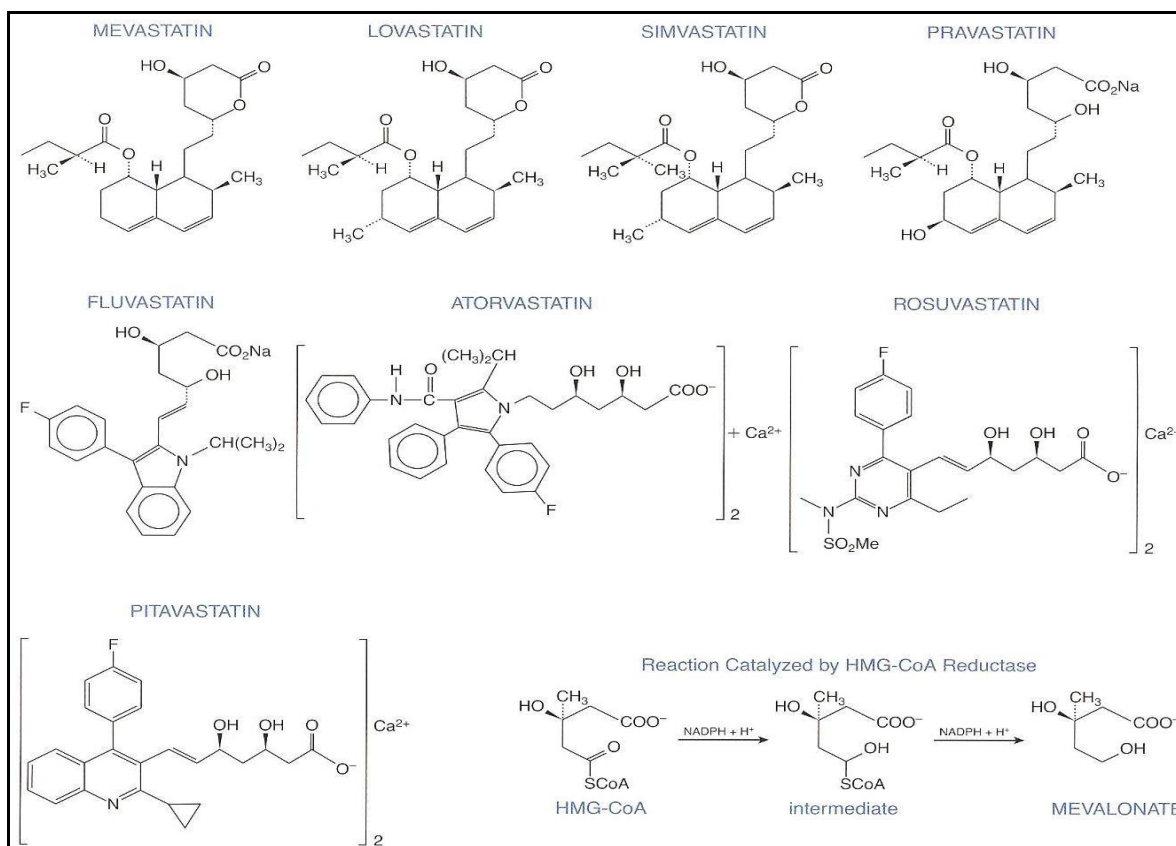
Σχήμα 8.14 Συγκεντρωτικός πίνακας μελετών για τα αποτελέσματα μετά από λήψη βιταμίνης E.^{55,60-64}

Οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί είναι πολλαπλοί και ποικίλλουν. Η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί και σε άλλες φαρμακευτικές ουσίες με πιθανή αντιοξειδωτική δράση, όπως οι στατίνες, οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

9. ΣΤΑΤΙΝΕΣ

9.1. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ HMG-CoA ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ

Οι αναστολείς της HMG-CoA αναγωγάσης (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase, αναγωγάση του υδροξυμεθυλο-γλουταρυλο-συνένζυμο A) ή αλλιώς στατίνες, είναι από τις νεότερες κατηγορίες φαρμάκων που καταπολεμά τη δυσλιπιδαιμία. Η πρώτη στατίνη απομονώθηκε από τη μούχλα του *Penicillium citrinum*. Οι στατίνες ταυτοποιήθηκαν ως αναστολείς της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης το 1976 από τον Endo και τους συνεργάτες του.⁸ Επόμενες μελέτες των Brown και Goldstein, επιβεβαίωσαν και καθιέρωσαν ότι οι στατίνες πράγματι δρουν αναστέλλοντας το ένζυμο αυτό.



Σχήμα 9.1. Χημική δομή των στατινών και η καθοριστική αντίδραση που αναστέλλουν⁸

Η πρώτη στατίνη που μελετήθηκε στον άνθρωπο ήταν η «compactin», η οποία μετονομάστηκε σε μεβαστατίνη. Ο Alberts και οι συνεργάτες του, ανέπτυξαν την πρώτη στατίνη που εγκρίθηκε από αρμόδιους φορείς για χρήση σε ανθρώπους. Ονομαζόταν λοβαστατίνη και είχε απομονωθεί από τον *Aspergillus terreus*. Υπάρχουν έξι ακόμα στατίνες οι οποίες είναι διαθέσιμες και κυκλοφορούν. Η πραβαστατίνη και η σιμβαστατίνη είναι παράγωγα της λοβαστατίνης. Η ατορβαστατίνη, η φλουβαστατίνη, η ροσουβαστατίνη και η πιταβαστατίνη είναι συνθετικά μόρια.⁸ Συγκεκριμένα στην Ελλάδα κυκλοφορούν όλες οι παραπάνω εκτός της πιταβαστατίνης.⁶⁵

9.2. ΔΟΜΗ ΣΤΑΤΙΝΩΝ

Όλες οι στατίνες έχουν ένα τμήμα στη δομή τους το οποίο μοιάζει με το τμήμα HMG και όλες αναστέλλουν την αναγωγή με τον ίδιο μηχανισμό. Η δομή του καταλυτικού τμήματος της HMG-CoA αναγωγής ταυτοποιήθηκε την τελευταία δεκαετία. Τα ογκώδη, υδρόφοβα τμήματα των στατινών καταλαμβάνουν τη «συνδεδεμένη με HMG τσέπη» και εμποδίζουν την πρόσβαση

του υποστρώματος - HMG.⁶⁶ Ο ισχυρός σύνδεσμος των στατινών οφείλεται στον μεγάλο αριθμό Van der Waals δεσμών μεταξύ των αναστολέων με το ένζυμο. Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δεσμών των διαφορετικών στατινών. Για παράδειγμα η ατορβαστατίνη και η ροσουβαστατίνη κάνουν τους περισσότερους δεσμούς με την HMG-CoA αναγωγή.⁶⁶ Αυτές οι διαφορές αντιπροσωπεύουν τη διαφορά στις σταθερές τιμές αναστολής. Οι στατίνες, ατορβαστατίνη, φλουβαστατίνη, λοβαστατίνη, πραβαστατίνη και σιμβαστατίνη μπορούν να μειώνουν τα επίπεδα της LDL κατά 24-60% ενώ η νεότερη ροσουβαστατίνη είναι περισσότερο αποτελεσματική, το οποίο πιθανόν να οφείλεται στους δεσμούς που διαμορφώνει με το ένζυμο.⁶⁷

Οι στατίνες διαφέρουν μεταξύ τους και ως προς τη λιποφιλία τους, λόγω της παρουσίας ή μη κάποιων πολικών δομών. Αυτή η διαφορά τους καθορίζει τη διανομή τους στη λιπιδική μεμβράνη και περαιτέρω τη σύνδεσή τους με το ένζυμο. Οι υδρόφιλες στατίνες (όπως πραβαστατίνη και ροσουβαστατίνη) παραμένουν συνδεδεμένες με την πολική επιφάνεια της μεμβράνης, ενώ οι λιπόφιλες (όπως ατορβαστατίνη και σιμβαστατίνη) αλληλεπιδρούν με τις λιπόφιλες περιοχές της μεμβράνης όπου υπάρχουν ακετυλο-ομάδες.⁶⁸

Αυτά τα χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται και με τη διαλυτότητα και τον τρόπο σύνδεσής τους, πιθανόν να ευθύνονται και για τις μεταβολικές διαφορές που έχουν μεταξύ τους. Οι λιπόφιλες στατίνες μπορούν να εισβάλλουν με παθητική διάχυση μέσα από τις μεμβράνες με αποτέλεσμα να διανεμηθούν ευκολότερα σε διάφορους ιστούς, σε σχέση με τις λιπόφοβες. Επίσης οι ιδιαίτεροι μηχανισμοί πρόσληψης των υδρόφιλων στατινών πιθανόν να ελαττώνουν την ικανότητά τους να δρουν σε συγκεκριμένες περιοχές του οργανισμού.

Σε συνδυασμό με τα ανωτέρω πρέπει να ληφθεί υπόψη η διαφορά και στην απέκκρισή τους λόγω της διαφορετικής τους δομής. Οι υδρόφιλες στατίνες απεκκρίνονται σχεδόν αμετάβλητες από την ουρογεννητική οδό ενώ οι λιπόφιλες πρέπει να υποστούν βιοχημικές μετατροπές για να απεκκριθούν από τον οργανισμό. Επιπλέον μπορεί κάποιες από αυτές να έχουν δραστικούς μεταβολίτες, όπως η ατορβαστατίνη και μπορεί να επιτείνεται η δράση τους.

9.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

9.3.1 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ (LIPID-DEPENDENT)

Οι στατίνες μειώνουν τα επίπεδα της LDL αναστέλλοντας το ένζυμο HMG-CoA αναγωγάση το οποίο παίζει καταλυτικό ρόλο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Με αυτό το τρόπο μειώνουν το ρυθμό μετατροπής του HMG-CoA σε μεβαλονικό οξύ και συνένζυμο A.⁶⁹

Μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, το οποίο οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου του LDL-υποδοχέα. Με την αύξηση των LDL-υποδοχέων στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και τη μείωση του καταβολισμού τους, αυξάνεται η αποβολή της LDL από το αίμα και μειώνονται τα επίπεδά της.

Πολλές μελέτες απέδειξαν ότι οι στατίνες μειώνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και αυξάνουν τα επίπεδα της HDL. Ωστόσο χρειάζονται περαιτέρω κλινικές μελέτες για να επιβεβαιωθούν αυτά τα ευρήματα.

Επιπλέον η ρύθμιση της παραγωγής NO και της ενδοθηλιακής λειτουργίας μπορεί να εξαρτάται από τη συγκέντρωση της LDL χοληστερόλης και τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες. Η πλασμαφαίρεση της LDL χοληστερόλης έχει δείξει ότι βελτιώνει ραγδαία την αγγειοδιαστολή.

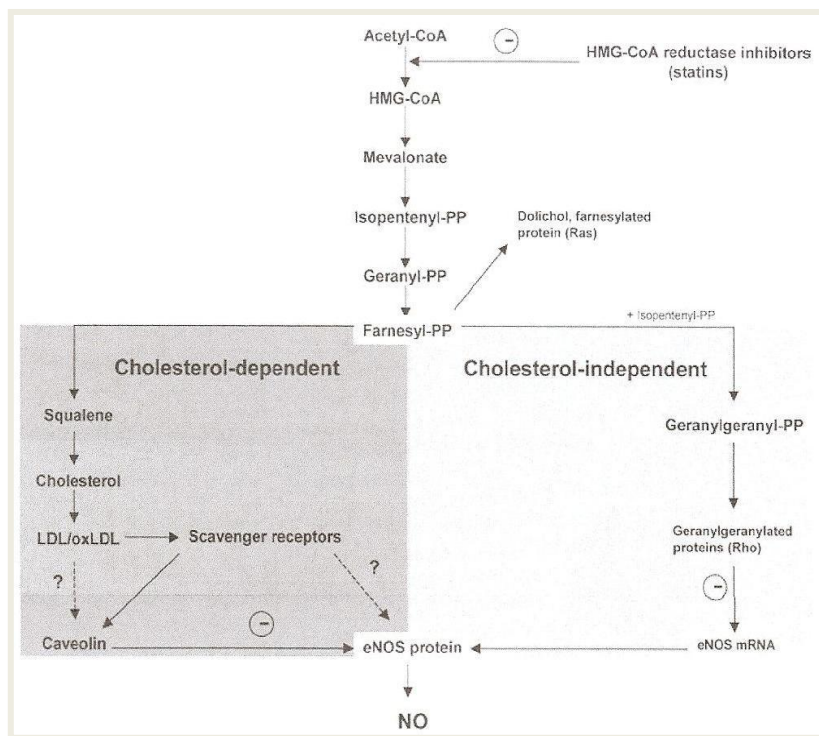
Επιπροσθέτως, σε καλλιεργημένα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, η eNOS mRNA ρυθμιζόταν αρνητικά από την ox-LDL. Επομένως ελαττώνοντας τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης μπορεί να αναστέλλεται η δυσλειτουργία της eNOS.⁷⁰

Ο βαθμός οξείδωσης της LDL χοληστερόλης είναι επίσης σημαντικός παράγοντας στη ρύθμιση της eNOS. Μελέτη σε ανθρώπινα και βοοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα έχει δείξει ότι η έκφραση της eNOS mRNA μειώνεται από την ox-LDL με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση. Θεραπεία με ατορβαστατίνη, σιμβαστατίνη και λοβαστατίνη περιόρισε τη μείωση της έκφρασης της eNOS παρουσία ox-LDL. Ωστόσο, σε πειράματα κυτταρικών καλλιεργειών οι στατίνες δεν μείωσαν τη συγκέντρωση της εξωτερικά προστιθέμενης χοληστερόλης, το οποίο υποδεικνύει πιθανότατα ότι υπάρχουν και άλλα μονοπάτια που συμβάλλουν στη ρύθμιση της eNOS.⁷⁰

Η οξειδωμένη LDL, σε πείραμα με βοοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα εντός υπερχοληστερολαιμικού ορού, έδειξε να ρυθμίζει θετικά τη caveolin και να προωθεί τη σύνδεσή της με την eNOS, το οποίο όπως αναφέρθηκε νωρίτερα οδηγεί σε αναστολή της δράσης του ενζύμου και μείωση της παραγωγής του NO. Παρομοίως, ο υποδοχέας ox-LDL CD36, φαίνεται να συμβάλλει στις λειτουργίες της ox-LDL όσον αφορά τη caveolin και τη ρύθμιση της eNOS.⁷⁰

9.3.2 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ (LIPID-INDEPENDENT)

Πολλαπλές μελέτες δείχνουν ότι οι ευεργετικές δράσεις των στατινών μπορεί να μην οφείλονται μόνο στη μείωση των λιπιδίων στο αίμα. Η ανάλυση της μελέτης MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering)⁷¹, της μελέτης LIPID (Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease)⁷² και της HPS (Heart Protection Study)⁷³ πρότειναν ότι οι δράσεις των στατινών δεν εξαρτώνται ολοκληρωτικά από τα επίπεδα της LDL.

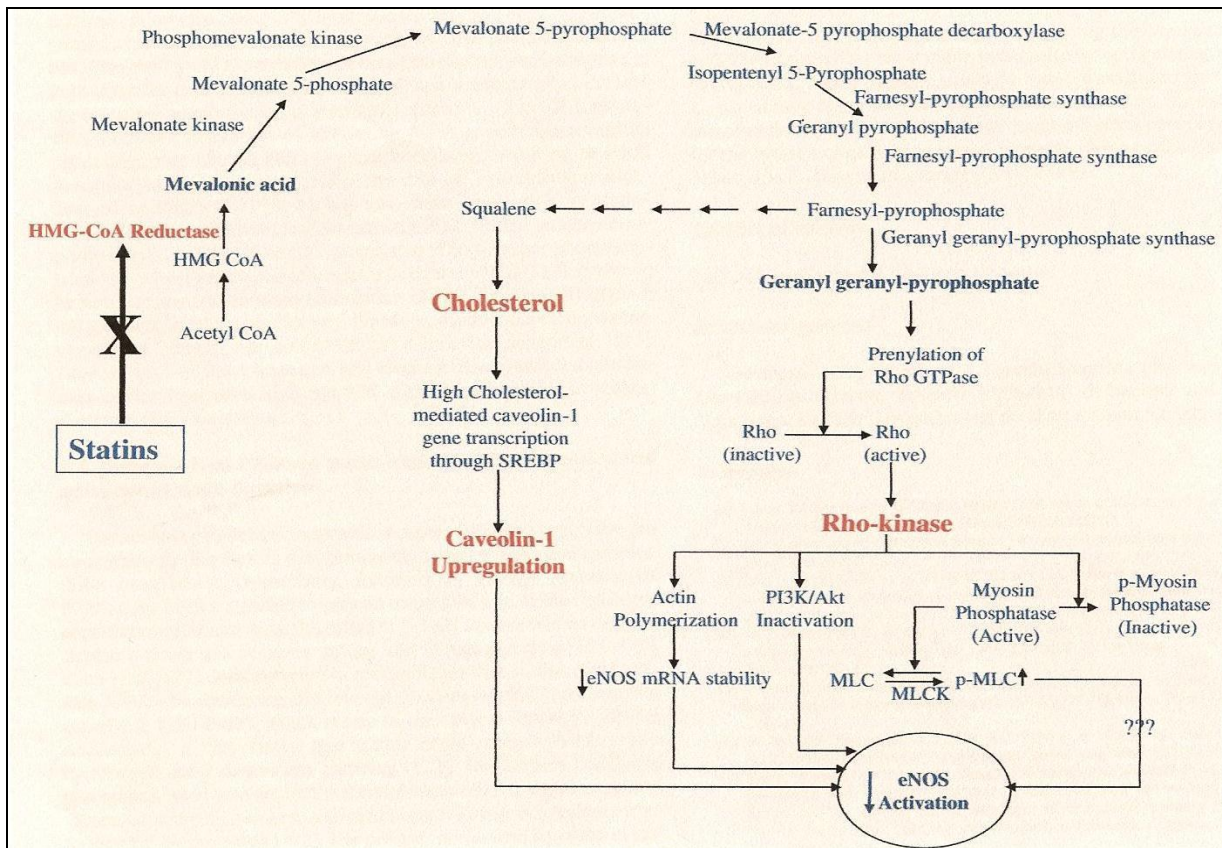


Την παρατήρηση αυτή επιβεβαίωσε η μελέτη ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial)⁷⁴, στην οποία η ατορβαστατίνη ελάττωνε τα καρδιαγγειακά συμβάματα σε υπερτασικούς ασθενείς οι οποίοι δεν ήταν δυσλιπιδαιμικοί. Επιπλέον έδειχνε την ικανότητά της να μειώνει τον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου και άλλων αγγειακών επιπλοκών.⁷⁵

Σχήμα 9.2. Ενεργοποίηση της eNOS από στατίνες, μέσω δυο διαφορετικών οδών⁵⁸

Τέτοιες πολυάριθμες μελέτες απέδειξαν ότι οι στατίνες έχουν «πλειοτροπικές» δράσεις⁷⁶, οι οποίες δεν περιορίζονται στη μείωση των επιπέδων των λιπιδίων. Οι δράσεις τους επομένως σχετίζονται και με το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

Συγκεκριμένα, η αναστολή σχηματισμού του μεβαλονικού οξέος οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα των μεταβολιτών του, όπως το γερανυλο πυροφωσφορικό οξύ, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση μικρών πρωτεϊνών GTP της οικογένειας Rho/RhoA/Rac/Cd42. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούνται και μεταφέρονται από το κυτοσόλιο στην πλασματική μεμβράνη, όπου συμμετέχουν στη λειτουργία διαφόρων ενδοκυτταρικών μονοπατιών μετάδοσης σημάτων, τα οποία είναι απαραίτητα για πολλές κυτταρικές διαδικασίες του καρδιαγγειακού συστήματος όπως η κυτταρική επιβίωση, ανάπτυξη, μετανάστευση και φλεγμονώδεις διαδικασίες.⁷⁷ Η ενεργοποίηση του μονοπατιού RhoA οδηγεί σε αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της eNOS.⁷⁸ Έχει αποδειχτεί η ικανότητα των στατινών να αναστέλλουν την ενεργοποίηση της RhoA σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα να αυξάνουν την παραγωγή και απελευθέρωση του NO.⁷⁷



Σχήμα 9.3. Μονοπάτι μετάδοσης σήματος που ρυθμίζει τη χοληστερόλη και την αναστολή ενεργοποίησης eNOS μέσω Rho κινασών⁶²

Οι στατίνες επίσης προωθούν τη σύνθεση της H₄B, η οποία μετατοπίζει την ισορροπία μακριά από τη ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου παραγόμενο υπέρ του NO. Παρόμοιο αποτέλεσμα έχουμε με την αναστολή της ενεργοποίησης της Rac η οποία μειώνει το σχηματισμό υπεροξειδίων από το

NADPH. Φαίνεται επομένως ότι οι στατίνες έχουν και ένα αντιοξειδωτικό ρόλο καθώς μπορούν να αναστείλουν ενεργά ενδιάμεσα οξυγόνου και αζώτου.⁷⁰

Άλλος ένας τρόπος με τον οποίο οι στατίνες ρυθμίζουν άμεσα την eNOS είναι η ικανότητά τους να ενεργοποιούν το μονοπάτι της PI3K/Akt, το οποίο ενεργοποιεί την eNOS φωσφορυλιώνοντάς τη στη θέση Ser 1177. Επιπλέον η Rho κινάση ρυθμίζει αρνητικά τη φωσφορυλίωση της eNOS αναστέλλοντας τη PKB/Akt. Φαίνεται ότι οι στατίνες αναστέλλοντας τις δράσεις του μονοπατιού Rho/Rho κινάση, οι οποίες εμποδίζουν με δυο τρόπους τη δράση της eNOS, προκαλούν παραγωγή NO.⁷⁸

9.3.2.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K/Akt

Οι κινάσες της φωσφατιδυλο-3-ινοσιτόλης είναι μια οικογένεια κινασών που σχετίζεται με ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά ένζυμα τα οποία σχετίζονται με μια εκπληκτικά ποικιλόμορφη ομάδα κυτταρικών λειτουργιών, όπως την ανάπτυξη κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την κινητικότητα, την επιβίωση και την ενδοκυτταρική κυκλοφορία.^{79,80}

Η φωσφορυλιωμένη PI3 ενεργοποιεί με τη σειρά της την κινάση επιβίωσης PKB ή Akt, οδηγώντας στον πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση του κυττάρου. Η Akt εμπλέκεται σε μονοπάτια επιβίωσης του κυττάρου αναστέλλοντας τη διαδικασία της απόπτωσης. Επίσης εμπλέκεται σε μονοπάτια που αφορούν τη σύνθεση πρωτεϊνών κι έτσι σχετίζεται με τη γενική ανάπτυξη και σύνδεση των ιστών.⁸⁰

Οι Derek και Hausenloy σε μελέτη τους πρότειναν ότι η καρδιοπροστατευτική δράση των στατινών, οφειλόταν σε άμεση ενεργοποίηση του μονοπατιού διάσωσης κινασών (reperfusion injury signalling kinase-RISK, μια ομάδα πρωτεϊνικών κινασών διάσωσης όπως η PI3k/Akt και η ERK1/2 οι οποίες προσφέρουν ισχυρή καρδιοπροστασία). Συγκεκριμένα, απέδειξαν ότι όταν χορηγείτο ατορβαστατίνη στη φάση μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης, σε απομονωμένες καρδιές ποντικών, το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου μειωνόταν κατά 50%.⁸¹ Αυτή η προστατευτική δράση προερχόταν από την ενεργοποίηση του μονοπατιού μετάδοσης PI3-Akt-eNOS, δεδομένου ότι αυτά τα αποτελέσματα μειώνονταν παρουσία αναστολέα PI3K και εξαφανίζονταν σε ποντίκια που είχαν έλλειψη της eNOS.⁸²

Μετάπειτα ακολούθησαν και άλλες μελέτες που επιβεβαίωσαν ότι οι στατίνες εμπλέκονται στην ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού.

9.4. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Έχουν γίνει πολλές μελέτες πάνω στη δράση των στατινών σε καρδιαγγειακούς ασθενείς. Οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση τους αποφέρει θετικά αποτελέσματα, που τις περισσότερες φορές δεν σχετίζονται με την ικανότητά τους να μειώνουν τα λιπίδια του ασθενούς και μόνο.

Η κλινική μελέτη ARMYDA (Atorvastatin for Reduction of Myocardial Damage during Angioplasty) πρότεινε ότι η θεραπεία με ατορβαστατίνη προ αγγειοπλαστικής, μειώνει τη βλάβη μυοκαρδίου από τους χειρισμούς στην εκλεκτική στεφανιαία παρέμβαση.⁸³ Παρομοίως η μελέτη ARMYDA – RECAPTURE πρότεινε ότι η υψηλή δόση ατορβαστατίνης βελτιώνει το κλινικό αποτέλεσμα ασθενών σε χρόνια θεραπεία με στατίνες, που υποβάλλονται σε διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση.⁸⁴

Επιπλέον μια μεγάλη μελέτη, PROVE-IT-TIMI σε 4.162 ασθενείς έδειξε ότι η χορήγηση ατορβαστατίνης μειώνει το σχετικό κίνδυνο (θάνατο, έμφραγμα μυοκαρδίου, εισαγωγή σε νοσοκομείο, εγκεφαλικό επεισόδιο) τα επόμενα δυο χρόνια κατά 16%, με στατιστική σημαντικότητα μέσα στις πρώτες δέκα μέρες από την εμφάνιση του οξέος στεφανιαίου επεισοδίου.

Συγκριτική μελέτη των Won Son et al. έδειξε σημαντική μείωση των επιπέδων λιποπρωτεϊνών, μεταλλοπρωτεϊνών, του ιστικού παράγοντα και του παράγοντα PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) μετά τη χορήγηση σιμβαστατίνης σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς.⁸⁵

Οι Yamada et al. έδειξαν ότι θεραπεία με ατορβαστατίνη μειώνει το λιπιδικό περιεχόμενο των αθηρωματικών πλακών σε ασθενείς με μέτρια καρωτιδική στένωση. Η διαπίστωση έγινε μετά από υπερηχογραφικό έλεγχο κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Sr. No.	Clinical trials	Patients characteristics	Statins evaluated	Outcomes	CVD risk & type of prevention
1	Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) [16]	Angina pectoris or previous myocardial infarction	Simvastatin	Significantly reduced overall mortality and coronary mortality	High & secondary prevention
2	Heart Protection Study (HPS) [17]	Coronary and peripheral artery disease	Simvastatin	Significantly reduced the rate of first major vascular events and peripheral vascular events	High & primary and secondary prevention
3	West Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS) [18]	Men with moderate hypercholesterolemia	Pravastatin	Reduced cardiac mortality and coronary events	Low & primary prevention
4	Cholesterol and Recurrent Events (CARE) [19,20]	Diabetic patients with CHD and average Cholesterol levels	Pravastatin	Reduced recurrent coronary events	Moderate & secondary prevention
5	Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) [21]	Patients with history of myocardial Infarction or unstable angina	Pravastatin	Reduced incidence of all pre-specified cardiovascular events	Moderate & secondary prevention
6	Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER) [22]	Elderly Individuals	Pravastatin	Reduced the risk of coronary heart disease	Moderate & primary and secondary prevention
7	Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention study (AFCAPS/TexCAPS) [7]	Patients with acute major coronary events	Lovastatin	Reduced acute major coronary events	Low & primary prevention
8	Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-lipid-lowering arm (ASCOT-LLA) [23]	Patients with average cholesterol profile and moderate CVD risk	Atorvastatin	Significantly reduced the primary end point of non-fatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease	Moderate & primary prevention
9	A Study to Evaluate the Use of Rosuvastatin in Subjects on Regular haemodialysis: An assessment of Survival and Cardiovascular Events (AURORA) [24]	Patients with diabetes mellitus	Rosuvastatin	Significantly reduced the rates of diabetic cardiac events	High & primary prevention
10	Justification for the Use of statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) [8]	Patients with elevated CRP levels	Rosuvastatin	Significantly reduced LDL and CRP levels and cardiovascular events	Low & primary prevention

CHD = coronary heart disease; CVD = cardiovascular disease; CRP, C-reactive protein; LDL = low-density lipoprotein.

Σχήμα 9.4. Οι ορόσημες μελέτες οι οποίες εδραίωσαν το όφελος της θεραπείας με στατίνες σε καρδιαγγειακή νόσο⁷⁸

Μελέτη των Crisby et al. σε ανθρώπινες καρωτιδικές πλάκες, οι οποίες είχαν απομονωθεί μετά από ενδαρτηρεκτομή, έδειξε ότι η χορήγηση πραβαστατίνης μειώνει τα λιπίδια, τη λιπιδική οξείδωση, τη φλεγμονή, την μεταλλοπρωτεϊνάση-2, το κυτταρικό θάνατο, και αυξάνει το κολλαγόνο και τον TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) στο περιεχόμενο των καρωτιδικών πλακών, επιβεβαιώνοντας τη δράση τους στη σταθεροποίησή τους.⁸⁶

Τέτοιες μελέτες ώθησαν τους ερευνητές να εξετάσουν και να ανακαλύψουν τους μηχανισμούς με τους οποίους οι στατίνες επιφέρουν τέτοια αποτελέσματα, είτε σε πειραματικά μοντέλα είτε σε ανθρώπους. Φαίνεται ότι οι στατίνες συμβάλλουν στη βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, με μείωση του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής και των θρομβογενών παραγόντων με στόχο τη μείωση της καρδιαγγειακής θνησιμότητας και θνητότητας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σε προηγούμενη εργασία της ερευνητικής μας ομάδας σε ασθενείς με καρωτιδική αθηρωμάτωση, μελετήθηκαν δείκτες σε δείγματα από καρωτίδες όπως η οξειδωμένη LDL (ox-LDL), η μεταλλοπρωτεϊνάση-9 (MMP-9), η νιτροτυροσίνη (NT), η μηλονική διαλδεύδη (MDA), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PCs) και εκτιμήθηκε η σχέση τους με τη σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών και την ανάπτυξη συμπτωματολογίας. Συγκεκριμένα αποδείξαμε ότι τα επίπεδα της οξειδωμένης LDL σχετίζονται με τα κλινικά συμπτώματα του αθηροσκληρωτικού ασθενούς. Επίσης συσχετίσαμε τα προϊόντα του υπεροξυνιτρόδους ανιόντος και της MMP-9 με την αστάθεια της πλάκας.⁸⁷

Σε μια άλλη μελέτη του εργαστηρίου μας σε φυσιολογικά (norm) και υπερχοληστερολαιμικά (chol) κουνέλια δείξαμε για πρώτη φορά in vivo, ότι η τριήμερη χορήγηση πραβαστατίνης μείωνε το μέγεθος του εμφράκτου σε norm και σε chol κουνέλια τα οποία εκτίθεντο σε ισχαιμία και επαναιμάτωση, ενώ επίσης ενεργοποιούσε την eNOS και την Akt με παράλληλη μείωση του νιτρο-οξειδωτικού στρες, ανεξάρτητα από την υπολιπιδαιμική της δράση. Η δράση αυτή επιβεβαιώθηκε με τη χορήγηση L-nitroarginine methyl ester (L-NAME), ενός αναστολέα συνθετάσης του NO, καθώς αναστέλλονταν οι ευεργετικές δράσεις της πραβαστατίνης.⁸⁸

Με αφορμή τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσουμε εάν η λήψη στατινών από ασθενείς, επιφέρει σταθεροποίηση ή μείωση της καρωτιδικής αθηρωματικής τους πλάκας. Επιπλέον μετρήσαμε πρωτεϊνικές κινάσες, ενδεικτικές για την ενεργοποίηση και την παραγωγή του NO καθώς και χαρακτηριστικό δείκτη νιτρο-οξειδωτικού στρες, για να αποκαλύψουμε το μοριακό μηχανισμό δράσης των στατινών και να αναδείξουμε νέους πιθανούς θεραπευτικούς στόχους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 ΕΓΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ

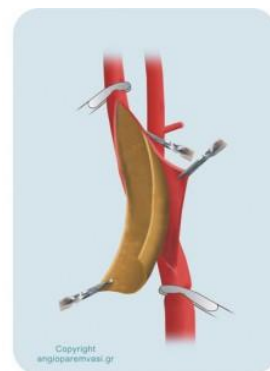
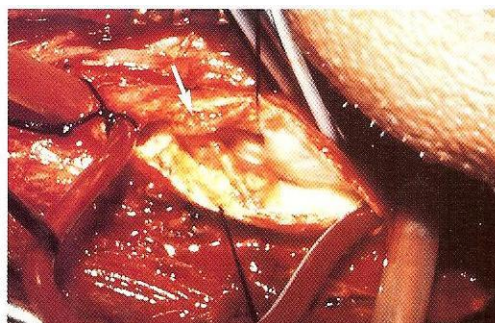
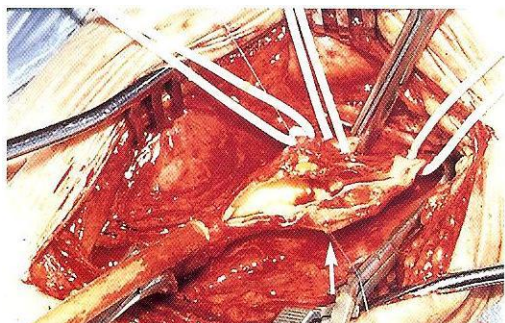
Το πρωτόκολλο της μελέτης κατατέθηκε στην Επιστημονική Επιτροπή και στην Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Ιπποκράτειον» σύμφωνα με τις αρχές των Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ηθικής. Η συλλογή των καρωτιδικών πλακών και κλινικών

στοιχείων άρχισε το Δεκέμβριο του 2007 και λήγει το Δεκέμβριο του 2012 στην 1^η Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ. Οι ασθενείς παράλληλα με την έγγραφη συγκατάθεσή τους για την επέμβαση, υπέγραφαν και τη συγκατάθεσή τους για τη λήψη της καρωτιδικής πλάκας για ερευνητικούς σκοπούς. Το παρεμβατικό κομμάτι της μελέτης αυτής πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Αγγειοχειρουργικής της 1^{ης} Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου, Δρ.Φραγκίσκα Σιγάλα.

2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Επεμβατική διαδικασία

Η καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή είναι μια επέμβαση η οποία είναι απαραίτητη όταν υπάρχει μεγάλη στένωση της καρωτίδας, δηλαδή της κύριας αρτηρίας που τροφοδοτεί με αίμα τον εγκέφαλο. Οι απαραίτητες προϋποθέσεις για να γίνει η εγχείριση είναι η διάγνωση μέσω κάποιων από τις παρακάτω τεχνικές όπως του υπερηχογραφήματος triplex καρωτίδων, της αξονικής τομογραφίας, της μαγνητικής είτε αξονικής τομογραφίας καρωτίδων και της μαγνητικής τομογραφίας εγκεφάλου. Πριν από την επέμβαση ακολουθούνται προεγχειρητικές εξετάσεις και καρδιολογικός έλεγχος.



Σχήμα 2.1. Αριστερά χειρουργικά παρασκευάσματα καρωτιδικών διχασμών δυο ασθενών. Τα βέλη υποδεικνύουν τις αθηρωματικές πλάκες ως ενδοτοιχωματικές αλλοιώσεις. Δεξιά σχηματική αναπαράσταση ενδαρτηρεκτομής.¹²

Η επέμβαση ξεκινά με μια πλάγια τομή στο λαιμό, συνήθως 8-10cm σε μήκος. Αφού παρασκευαστεί η καρωτιδική αρτηρία, αποκλείονται προσωρινά τα κλαδιά της, ανοίγεται η

αρτηρία κατά μήκος και αφαιρείται προσεκτικά η αθηρωματική πλάκα. Έπειτα ράβεται με πολύ λεπτά ράμματα είτε άμεσα είτε με χρήση εμφλώματος. Το εμφύλωμα μπορεί να είναι είτε πλαστικό είτε να είναι ένα μικρό τμήμα φλέβας ενός κάτω μέλους, το οποίο έχει ήδη ληφθεί από το χειρουργό. Το επιφανειακό τραύμα ράβεται με ράμμα που αφαιρείται μετά από 5-7 ημέρες. Μετά την ολοκλήρωση της καρωτιδικής ενδαρτηρεκτομής οι ασθενείς παραμένουν στο νοσοκομείο για 2-4 ημέρες.

Συλλογή δειγμάτων

Οι καρωτιδικές πλάκες συλλέχθηκαν από 29 τυχαίους ασθενείς, οι οποίοι είχαν >70% στένωση της καρωτιδικής αρτηρίας και έκαναν ενδαρτηρεκτομή. Τα δημογραφικά δεδομένα, τα κλινικά δεδομένα, τα φάρμακα, οι παράγοντες κινδύνου και οι αγγειακές συνοσηρότητες καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Καταγράφηκε η φαρμακοθεραπεία τους και χωρίστηκαν σε ομάδες ασθενών που λάμβαναν στατίνες ή όχι, καθώς και σε ομάδες σταθερής και ασταθούς καρωτιδικής πλάκας. Οι ασθενείς εκτιμήθηκαν προεγχειρητικά από νευρολόγο για να αξιολογηθεί η συμπτωματολογία τους. Οι συμπτωματικοί ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν βάση παρουσίας εγκεφαλικού επεισοδίου, παροδικού ισχαιμικού επεισοδίου και αμαύρωσης (δηλαδή παροδικής έλλειψης της όρασης). Επίσης υποβλήθηκαν σε αξονική τομογραφία εγκεφάλου για τον εντοπισμό εγκεφαλικού εμφράκτου. Αγγειογραφία έγινε σε όλους τους ασθενείς και ο βαθμός στένωσης καθορίστηκε σύμφωνα με τα κριτήρια NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial).

Προετοιμασία δειγμάτων

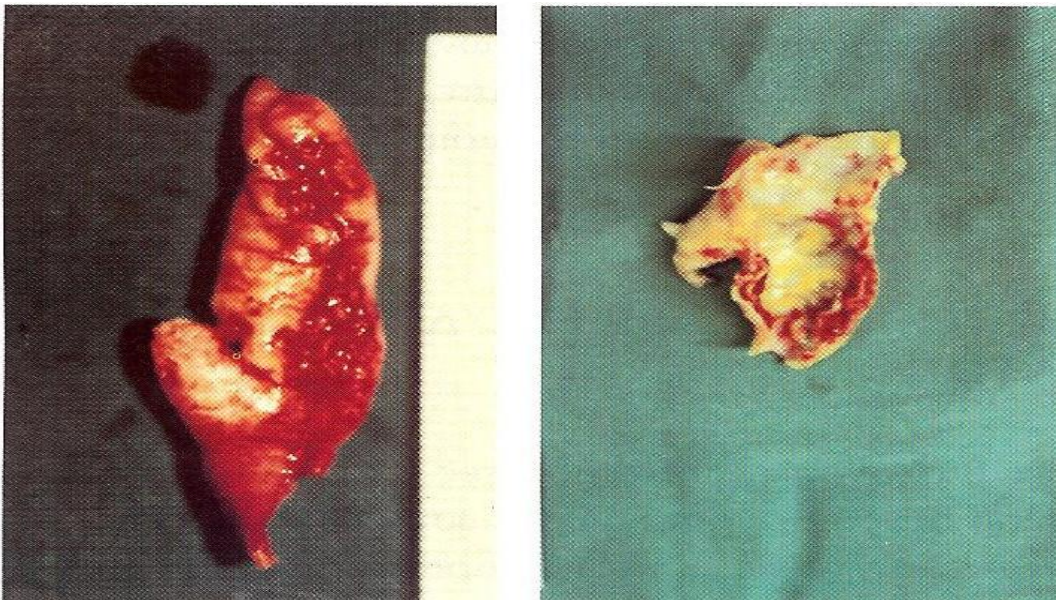
Όλα τα δείγματα καρωτιδικών πλακών που απομονώθηκαν χωρίστηκαν σε δυο μέρη. Το ένα κομμάτι αποθηκεύτηκε σε 10% ρυθμιστικό διάλυμα με 4% φορμαλδεΰδη για 24 ώρες κι έπειτα παρασκευάστηκε σε γυάλινο πλακάκι με παραφίνη, με σκοπό την ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Το δεύτερο κομμάτι αποθηκεύτηκε κατευθείαν στους -80°C για ανάλυση MDA και ανάλυση pNOS και pAkt και των ολικών μορφών τους, με τη μέθοδο Western Blot.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΣΥΝΟΛΟ	ΜΕ ΣΤΑΤΙΝΗ	ΧΩΡΙΣ ΣΤΑΤΙΝΗ
Δημογραφικά δεδομένα			
Αριθμός	29	14	15
Μέση ηλικία	71	70	71.6
Άρρεν/ Θήλυ	23/6	11/3	12/3
Κάπνισμα	15	7	8
Κλινικά δεδομένα			
Υπέρταση	25	13	12
Διαβήτης	9	5	4
Υπερλιπιδαιμία	18	13	5
Στεφανιαία νόσο ή ισχαιμική καρδιακή νόσο	16	9	7
Ανεύρυσμα	2	1	1
Περιφερική αγγειακή αποφρακτική νόσος	10	5	5
Κλινικά συμπτώματα			
Εγκεφαλικό	7	2	5
Παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο	6	1	5
Αμαύρωση	3	2	1
Στένωση			
<90	11	6	5
≥90	18	8	10
Τομογραφία εγκεφάλου (θετική/ αρνητική)	16/13	5/9	11/4
Καρωτιδική πλάκα			
Ασταθής	14	3	11
Σταθερή	15	11	4
Φάρμακα			
Β αναστολείς	6	3	3
αΑΜΕΑ	22	11	11
Αναστολείς διαύλων Ca ²⁺	15	8	7

Σχήμα 2.2. Πίνακας δημογραφικών και κλινικών στοιχείων των ασθενών

2.3 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

Ειδικός παθολογοανατόμος ο οποίος δε γνώριζε τα κλινικά δεδομένα, εξέτασε κάθε δείγμα για να αξιολογήσει τη μορφολογία της αθηρωματικής πλάκας σύμφωνα με την ταξινόμηση της American Heart Association. Σύμφωνα με αυτή την ταξινόμηση οι καρωτιδικές πλάκες χαρακτηρίστηκαν ως ιωδο-αθηρωματικές (τύπου V) και επιπλεγμένες (τύπου VI). Ο τελευταίος τύπος, ο οποίος θεωρήθηκε και ασταθής, περιελάμβανε πλάκες με ενδοπλακική αιμορραγία, έλκος, ή θρόμβο.



Σχήμα 2.3. Τυπικές επιπλεγμένες πλάκες με έντονα στοιχεία εξελκώσεων ή και αιμορραγίας παρατηρούνται στις δυο αθηρωματικές πλάκες του καρωτιδικού διχασμού.¹²

3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 WESTERN BLOT

Εισαγωγή

Είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική, σχεδιασμένη να ανιχνεύει με ειδικό τρόπο πρωτεΐνες σε δείγμα ομογενοποιημένου ή από εκχύλισμα ιστού. Η μέθοδος πρωτοεμφανίστηκε στο εργαστήριο του George Stark στο Stanford. Η τεχνική πήρε το όνομά της από τον W. Neal Burnette και Sushant Bhat⁸⁹ σε αντιδιαστολή προς την τεχνική προσδιορισμού DNA Southern blot η οποία αναπτύχθηκε από τον Edwin Southern.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση του αντισώματος με συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από αμινοξέα που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς. Το αντίσωμα αναγνωρίζει συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων, το επίτομα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ανιχνεύουμε εκλεκτικά την πρωτεΐνη που διαθέτει την παραπάνω αλληλουχία, ανάμεσα σε μείγμα πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών. Έτσι, με την αναλυτική τεχνική Western Blot μπορούμε να ανιχνεύσουμε μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε κυτταρικά διαλύματα καθώς και να ποσοτικοποιήσουμε την έκφρασή της.^{90,91}

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει πέντε στάδια:

- ❖ προετοιμασία του δείγματος
- ❖ gel ηλεκτροφόρηση για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών του δείγματος ανάλογα με το μέγεθος
- ❖ διαδικασία transportation για την μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel σε μεμβράνη PVDF
- ❖ επώαση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα για την ειδική ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης
- ❖ χρήση αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας, για την ανίχνευση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντισώματος

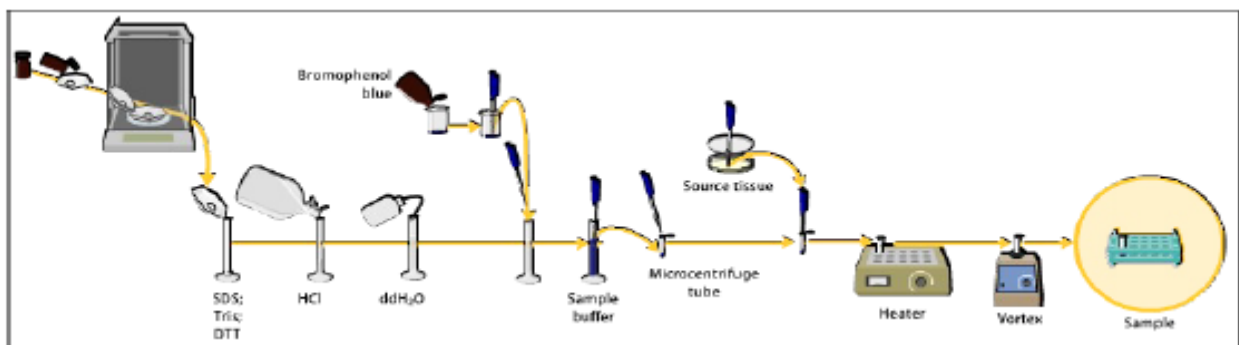
Περιγραφή μεθόδου

Προετοιμασία δείγματος

Η διαδικασία ομογενοποίησης των ανθρώπινων καρωτιδικών πλακών γίνεται υπό ξηρό πάγο. Είναι υψίστης σημασίας η επεξεργασία να πραγματοποιείται σταθερά στους -70°C περίπου, ούτως ώστε να διατηρείται ο ιστός στην αρχική του κατάσταση και να μην μετουσιώνονται οι πρωτεΐνες που θα προσδιοριστούν.

Σε ειδικό πορσελάνινο γουδί, το οποίο βρίσκεται μέσα σε ξηρό πάγο, τοποθετείται ιστός και παροχετεύεται υγρό άζωτο. Με γρήγορες κινήσεις και το γουδοχέρι, ο ιστός θρυμματίζεται μέχρι να γίνει πούδρα. Η πούδρα συλλέγεται με σπάτουλα και τοποθετείται σε erpendorf τα οποία έχουν ειδική ετικέτα.

Προετοιμάζεται ειδικό buffer, το Lysis buffer το οποίο περιέχει 1% Triton X, 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 50mM NaF, 1mM EDTA, 0.5% NaDOC, 1% SDS. Αναμιγνύονται 20ml από το Lysis buffer με 25μl inhibitors (proteases/ phosphatases). Το διάλυμα αυτό διατηρείται μέσα στο ψυγείο και χρησιμοποιείται για τη διάλυση του ιστού.



Σχήμα 3.1. Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων

Σε μια καινούρια σειρά erpendorf βάζουμε 300μl από το διάλυμα, συγκεκριμένη ποσότητα ιστού, προσθέτουμε επιπλέον ποσότητα διαλύματος όπου χρειάζεται ανάλογα με την ποσότητα του ιστού. Αναμιγνύουμε καλά το μίγμα με vortex. Γίνεται ήπια ανακίνηση σε πάγο για 15 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 11.000 στροφές και στους 4°C .

Το υπερκείμενο υγρό τοποθετείται σε καινούρια σειρά erpendorf. Το ίζημα φυλάσσεται στη βαθιά κατάψυξη. Από το υπερκείμενο αρκούν 5μl, τα οποία τα βάζουμε σε άλλη σειρά erpendorf μαζί με 45μl Tris. Το υπόλοιπο υπερκείμενο επίσης φυλάσσεται στη βαθιά κατάψυξη. Αναμιγνύονται καλά και λαμβάνουμε 10μl δείγματος τα οποία προσθέτουμε με 90μl δις απιονισμένο νερό σε νέα σειρά erpendorf. Τέλος γίνεται ανάμιξη 4:1 αυτού του διαλύματος με ειδικό αντιδραστήριο Bradford, το οποίο προσδίδει χρώμα στο διάλυμα, προς τελικό όγκο 1ml. Τα δείγματα αφήνονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα μετράται η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 595nm.

Φωτομέτρηση στα 595nm			Φωτομέτρηση στα 595nm		
A/A	Ιστοί	Απορρόφηση	A/A	Ιστοί	Απορρόφηση
1	2	0.695	16	19	0.752
2	3	0.769	17	20	0.561
3	5	0.634	18	21	0.588
4	6	0.643	19	22	0.726
5	8	0.584	20	23	0.652
6	9	0.613	21	24	0.525
7	10	0.703	22	25	0.672
8	11	0.642	23	26	0.555
9	12	0.656	24	28	0.623
10	13	0.589	25	35	0.601
11	14	0.613	26	36	0.591
12	15	0.513	27	38	0.607
13	16	0.653	28	40	0.615
14	17	0.654	29	41	0.667
15	18	0.678			

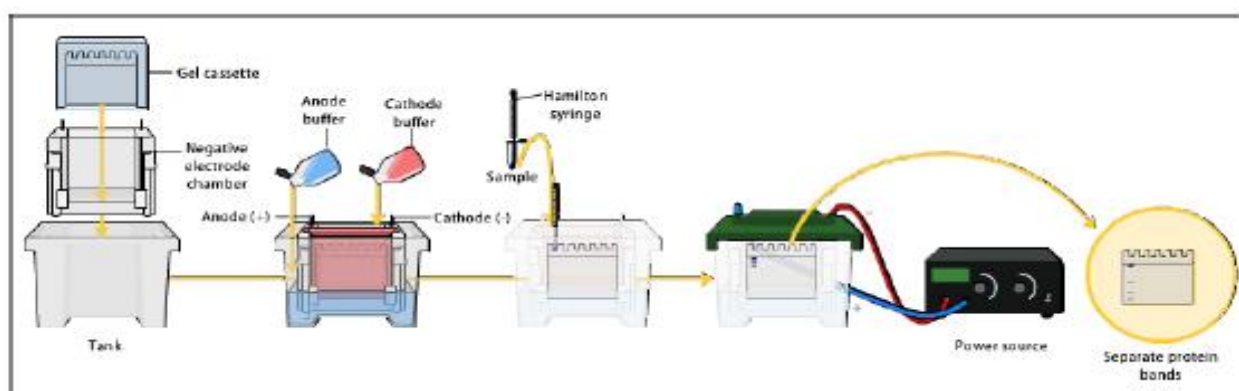
Σχήμα 3.2. Αποτελέσματα φωτομέτρησης

Η διαδικασία αυτή είναι σημαντική διότι με αυτό το τρόπο προσδιορίζουμε την ποσότητα της πρωτεΐνης που βρίσκεται σε κάθε δείγμα και κάνοντας ειδικούς υπολογισμούς γνωρίζουμε πόση

ποσότητα από το κάθε δείγμα χρειάζεται να αναμιχθεί με Lysis buffer και Sample buffer για να ξεκινήσουμε το Western Blot με τις προδιαγραφές που μας ενδιαφέρει.

Αφού έχει ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία ανάβουμε το υδατόλουτρο στους 100°C. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς που έχουν προηγηθεί προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα δείγματος (από αυτό που έχει φυλαχθεί στη βαθιά κατάψυξη), Lysis buffer και Sample buffer, και αναδεύουμε με καλό πιπετάρισμα. Στη συνέχεια βάζουμε τα δείγματα σε στατώ και το τοποθετούμε στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά. Έπειτα ακολουθούν 2 λεπτά σε πάγο, ένα quick spin στη φυγόκεντρο και είτε αποθηκεύουμε τα έτοιμα πλέον δείγματα στους -80°C είτε συνεχίζουμε τη διαδικασία του Western Blot.

Ηλεκτροφόρηση



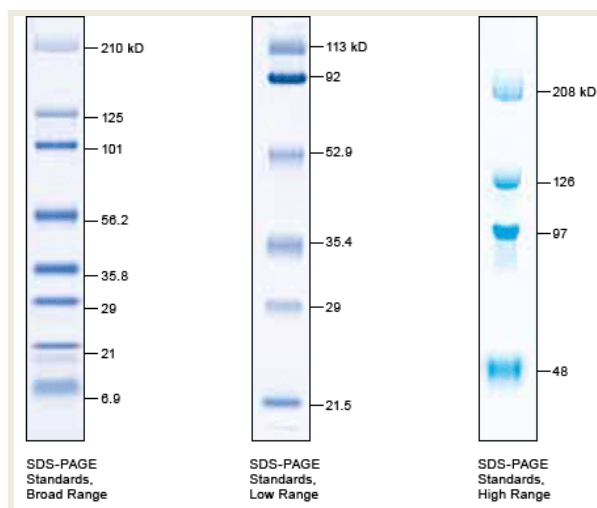
Σχήμα 3.3. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφορητική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης με SDS. Οι πηκτές ακρυλαμίδης είναι χημικά αδρανείς και διάφανες, με πόρους που δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών της ακρυλαμίδης. Όταν εφαρμοστεί τάση στη γέλη ακρυλαμίδιου, οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν πάνω σε αυτή με διαφορετικές ταχύτητες αναπτύσσοντας διακριτές ζώνες. Η σύσταση της γέλης καθορίζει τον τρόπο διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Ανάλογα με το μοριακό βάρος της κάθε πρωτεΐνης που θέλουμε να προσδιορίσουμε, αλλάζει η σύσταση της γέλης.

Μοριακό βάρος πρωτεΐνης	Σύσταση running gel
<60kD	9-11%
60-85kD	8-10%
85-140kD	7.5%

Σχήμα 3.4. Συσχέτιση μοριακού βάρους πρωτεΐνης με σύσταση running gel

Προετοιμάζουμε σε δυο falcon τις δυο πηκτές το running gel και το stacking gel. Η σύσταση του running gel, όπως προαναφέρθηκε σχετίζεται με το βάρος της πρωτεΐνης που θέλουμε να προσδιορίσουμε και τα συστατικά από τα οποία αποτελείται είναι: acrylamide/bisacrylamide 30%, 4X Running buffer, dd H₂O, APS 10% (καταλύει τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης) και Temed (συμπλοκοποιητής). Μόλις αναδευτεί το running gel το βάζουμε στις ειδικές γυάλινες



πλάκες της συσκευής του Western Blot και περιμένουμε να πήξει. Αφού πήξει ετοιμάζουμε το stacking gel το οποίο αποτελείται από acrylamide/bisacrylamide 30%, 4X Stacking buffer, dd H₂O, APS 10%, Temed και Bromophenol blue (χρωστική). Το βάζουμε και αυτό πάνω από το running gel και εισάγουμε τα χτενάκια της συσκευής τα οποία θα δημιουργήσουν τα ειδικά κελιά, όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

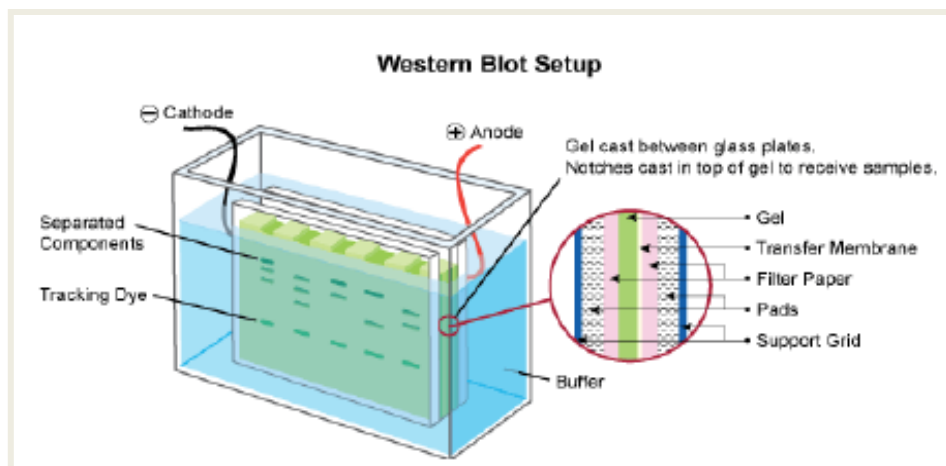
Σχήμα 3.5. Ενδεικτικές μπάντες marker⁹²

Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το running gel, στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Σκοπός είναι τα δείγματα να συγκεντρωθούν στην πρώτη πηκτική και έπειτα να διαχωρισθούν σιγά σιγά στη δεύτερη.

Στα κελιά που δημιουργούνται από τα χτενάκια τοποθετείται αρχικά ο marker και έπειτα τα δείγματα. Ο marker (*Precision Plus Protein, All Blue Standards - BIORAD*) είναι ένα μίγμα πρωτεϊνών με ορισμένα μοριακά βάρη, διαθέσιμο στο εμπόριο. Είναι έγχρωμος και διαμορφώνει

ορατές μάντες που μας βοηθούν να ταυτοποιήσουμε τις πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα δείγματά μας.

Αφού τοποθετηθούν τα δείγματα στα κελιά συνδέουμε τη συσκευή και ξεκινάμε την ηλεκτροφόρηση στα 75V αρχικά, μέχρι να εμφανιστεί ο marker στο running gel, και στη



συνέχεια ρυθμίζουμε τη συσκευή στα 120V. Ο χρόνος που χρειάζεται να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες ποικίλλει και σχετίζεται με την επιθυμητή πρωτεΐνη.

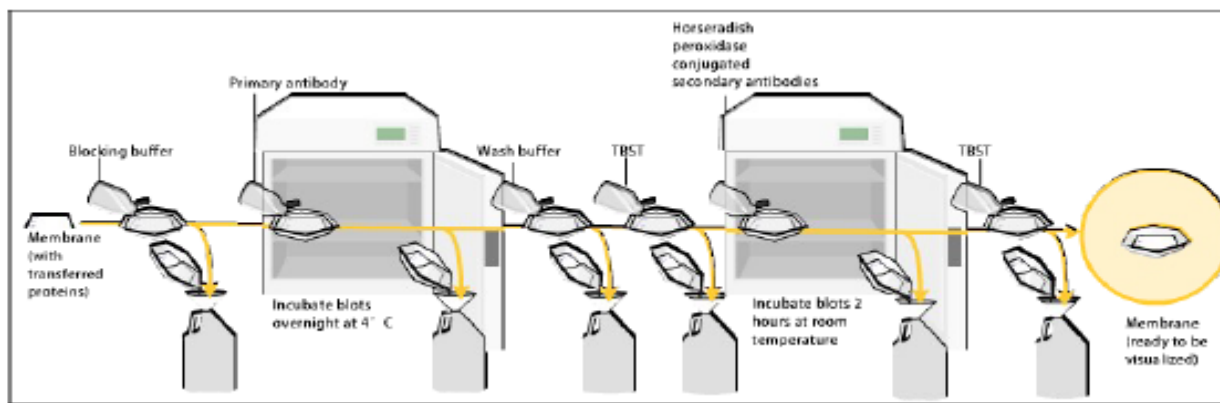
Σχήμα 3.6. Παράδειγμα marker για ταυτοποίηση πρωτεϊνών⁹²

Transportation

Με το πέρας του χρόνου αποσυνδέουμε τη συσκευή και βγάζουμε τις πηκτές, πάνω στις οποίες έχουν τρέξει οι πρωτεΐνες. Εντωμεταξύ επωάζουμε τις ειδικές μεμβράνες PVDF πολύ προσεκτικά και τοποθετούμε τις πηκτές μαζί με τις μεμβράνες σε ειδική συσκευή για τη διαδικασία του transportation, δηλαδή της μεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη PVDF. Η διαδικασία της μεταφοράς διαρκεί για περίπου μια ώρα στα 100V.

Διαδικασία μετά το transportation

Σε αυτή τη φάση του πειράματος, είτε αποθηκεύουμε τις μεμβράνες στους -80°C είτε συνεχίζουμε την πειραματική διαδικασία. Στη δεύτερη περίπτωση ακολουθεί επώαση των μεμβρανών με blocking buffer για μια ώρα. Στόχος του διαλύματος αυτού είναι να επικαλύψει τυχόν κενά που υπάρχουν πάνω στην μεμβράνη και δεν έχουν καλυφθεί από πρωτεΐνες, ούτως ώστε να μην υπάρξουν αλληλεπιδράσεις του αντισώματος -που θα προστεθεί αργότερα- με τη μεμβράνη και υπάρξει θόρυβος.



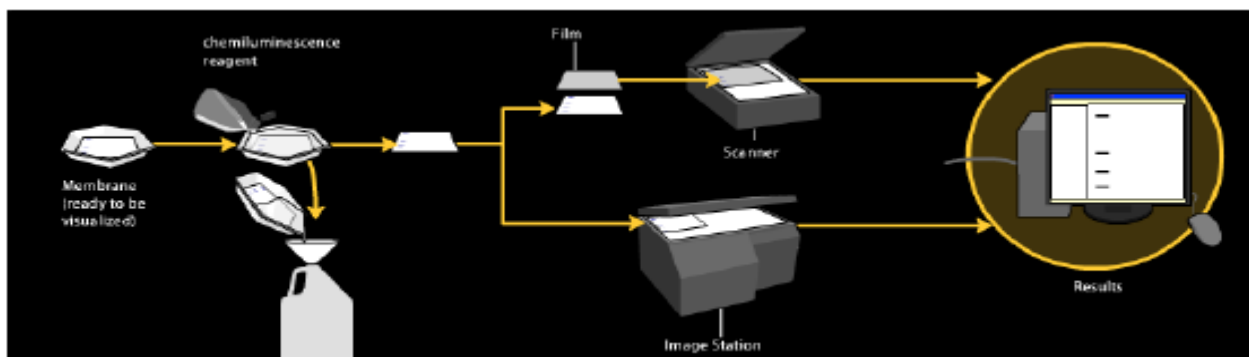
Σχήμα 3.7. Διαδικασία επώσεων

Έπειτα γίνονται εκπλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα TBS-Tween, το οποίο απομακρύνει την περίσσεια του blocking buffer, το οποίο δεν έχει συνδεθεί με τη μεμβράνη. Ακολουθεί επώση με πρωτογενές αντίσωμα (*p-Akt (S473) Rabbit Ab, Akt Rabbit Ab, p-eNOS (S1177) Rabbit Ab, eNOS Rabbit Ab – Cell Signaling*) για μια ημέρα. Το πρωτογενές αντίσωμα αναγνωρίζει τις ειδικές πρωτεΐνες και συνδέεται με αυτές. Είναι σημαντικό η επώση να γίνεται στους 4°C για να διατηρείται η δραστηριότητα του αντισώματος και να γίνει σωστά η σύνδεση με τις επιθυμητές πρωτεΐνες.

Την επόμενη ημέρα, εκπλένουμε τις μεμβράνες από το πρωτογενές αντίσωμα με το ρυθμιστικό διάλυμα TBS-Tween και επωάζουμε με το δευτερογενές αντίσωμα (*Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) - HRP Conjugate - BIORAD*) για δυο ώρες. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ειδικό για το πρωτογενές και σκοπός του είναι να δημιουργήσει ένα μεγαλύτερο σύμπλοκο πρωτεϊνών το οποίο θα ανιχνεύεται καλύτερα.

Σκοτεινός θάλαμος και εμφάνιση

Κάνουμε και πάλι πλύσεις με TBS-Tween για να απομακρυνθεί το δευτερογενές αντίσωμα και επωάζουμε για πέντε λεπτά με ειδικά αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας. Αυτά προσδένονται σε ειδικές θέσεις του δεύτερου αντισώματος και εκπέμπουν σήμα το οποίο καταγράφεται σε φωτογραφικό φιλμ.



Σχήμα 3.8. Διαδικασία εμφάνισης

Η διαδικασία εμφάνισης, δηλαδή η εμφάνιση του φωτογραφικού φιλμ, λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό θάλαμο και η διαδικασία είναι ταχύτατη, διότι το σήμα που εκπέμπει η μεμβράνη ελαττώνεται όσο περνάει ο χρόνος. Πάνω στο φωτογραφικό φιλμ αποτυπώνονται οι μάντες τις οποίες έπειτα επεξεργαζόμαστε και εξάγουμε ποσοτικά συμπεράσματα.

Stripping

Οποιαδήποτε μεμβράνη μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί, μέχρι και τρεις φορές, εάν υποστεί μια ειδική διαδικασία απογύμνωσης από τα αντισώματα. Η διαδικασία περιλαμβάνει την έκπλυση με TBS-Tween και επώαση με το stripping buffer –το οποίο καταστρέφει τους δεσμούς των πρωτεϊνών με τα αντισώματα- σε υδατόλουτρο για μισή ώρα. Έπειτα προστίθεται blocking buffer και ακολουθούνται τα βήματα, όπως αναφέρονται παραπάνω. Συνήθως ανιχνεύονται πρώτα οι φωσφορυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών, οι οποίες είναι πιο ευαίσθητες, και έπειτα οι ολικές τους μορφές.

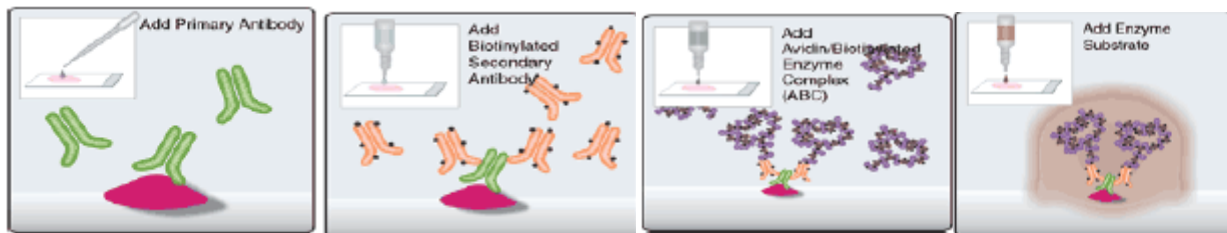
3.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Εισαγωγή

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί χρησιμοποιούν αντισώματα ως εκλεκτικά αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό ουσιών με αντιγονικές ιδιότητες, που δεσμεύονται από αυτά. Η πρώτη ανοσοχημική μέθοδος προτάθηκε από τους Berson και Yalow το 1959 και αφορούσε τον προσδιορισμό της ινσουλίνης. Έκτοτε οι ποιοτικοί αυτοί προσδιορισμοί έχουν εξελιχθεί και χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα.⁹³

Περιγραφή μεθόδου

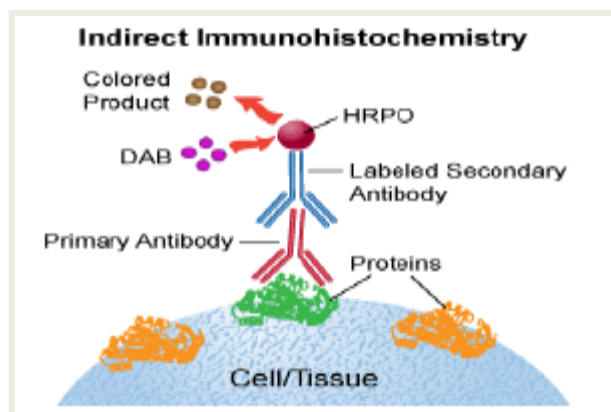
1. Ο ιστός, στην περίπτωση μας καρωτιδικός ιστός, τεμαχίζεται και παρασκευάζεται με παραφίνη σε ειδικό γυάλινο πλακάκι, το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου για πολύ καιρό.
2. Τα πλακάκια τοποθετούνται σε ειδική θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C για να λιώσει η παραφίνη.
3. Έπειτα τα βάζουμε σε ειδικό μπανάκι, μέσα σε ξυλόλη για 15 λεπτά και διαδοχικά σε αιθανόλη σε διαφορετικές αραιώσεις. Αυτή η διαδικασία στόχο έχει την ενυδάτωση την ιστού.
4. Ξεπλένουμε με ρυθμιστικό διάλυμα TBS.
5. Σε ειδική κασετίνα, η οποία διατηρεί μια υγρασία ούτως ώστε να μην αφυδατωθεί ο ιστός και καταστραφεί, τοποθετούμε τα πλακάκια. Εκεί γίνεται αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης από υπεροξείδιο του υδρογόνου.
6. Γίνεται πάλι έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα TBS.
7. Στη συνέχεια σε ειδικό μπανάκι, τοποθετώ τα πλακάκια και γεμίζω μέχρι να καλυφθούν με διάλυμα κιτρικών. Τα τοποθετώ σε φούρνο μικροκυμάτων και ελέγχω να μην εξατμιστεί μεγάλη ποσότητα των κιτρικών. Σε αυτή της φάση αποκαλύπτονται οι θέσεις αντιγόνων και γίνονται πιο προσβάσιμες οι πρωτεΐνες.
8. Αφήνουμε να κρυώσουν τα πλακάκια και ξεπλένουμε με TBS.
9. Γίνεται επώαση με ultra V block για 7 λεπτά για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Έτσι όταν προστεθεί το πρωτογενές αντίσωμα θα συνδεθεί μόνο στις ειδικές θέσεις όπου εμφανίζεται και μεγάλη συγγένεια.



Σχήμα 3.9. Απεικόνιση πρόσδεσης αντισωμάτων στις πρωτεΐνες⁹³

10. Γίνεται έκπλυση με TBS.
11. Προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody – *eNOS (6H2) Mouse Ab, Cell Signaling*) σε ειδική αραιώση (1:100) και αφήνεται όλη τη νύχτα στους 4°C.

12. Την επόμενη μέρα, γίνονται τρεις πλύσεις με TBS και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα (primary antibody enhancer) το οποίο είναι συνδεδεμένο με βιοτίνη, για 10 λεπτά.
13. Γίνεται έκπλυση με TBS.
14. Επωάζουμε με HRP (horseradish peroxidase) polymer για 15 λεπτά. Αυτό οδηγεί στη δημιουργία συμπλέγματος στρεπταβιδίνης – βιοτίνης – υπεροξειδάσης.
15. Γίνεται έκπλυση με TBS.
16. Ακολουθεί χρώση με DAB (διαμινοβενζιδίνη) το οποίο είναι χρωμογόνο και αντιδρά με την υπεροξειδάση παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, δίνοντας καφέ χρώμα.



Σχήμα 3.10. Απεικόνιση τελικού συμπλέγματος⁹³

17. Γίνεται έκπλυση με νερό και προστίθεται δεύτερο χρωμογόνο, η αιματοξυλίνη, η οποία παρέχει αντίθεση που βοηθά να φαίνεται εντονότερα η πρώτη χρώση.
18. Για την αποθήκευση του ιστού αφήνεται να αφυδατωθεί.
19. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο

Φωτογράφιση και αξιολόγηση

Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για την eNOS, το οποίο έδινε χαρακτηριστική χρώση κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Η θετική χρώση φωτογραφήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Infinity Capture 2CB 191024 και του απλού φωτονικού μικροσκοπίου. Η εκτίμηση της έντασης της χρώσης έγινε από ειδικευμένο παθολογοανατόμο, σε μεγέθυνση x25, x100, x200, x400.

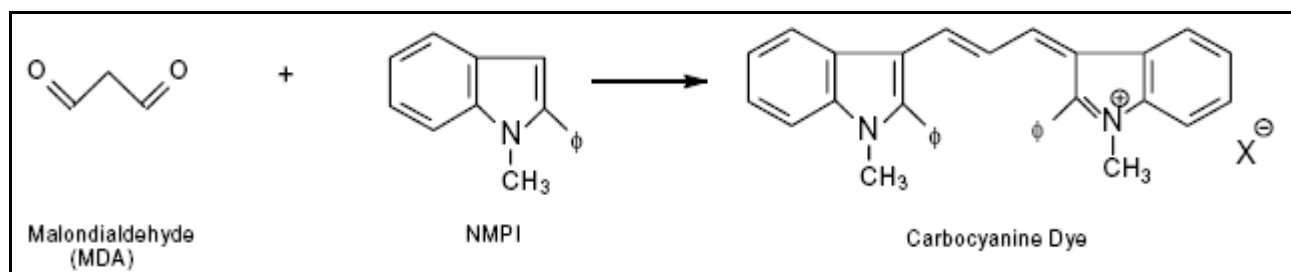
Η αξιολόγηση έγινε ημιποσοτικά βάσει του άρθρου «Immunohistochemical localization of endothelial isoform (eNOS) in human cerebral arteries and the aorta» των Liang et al. και εκτιμάται παρακάτω ως: negative or faint (-/±), weak (+), moderate (++) και intense (+++).⁴⁹

3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΗΛΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΛΔΕΥΔΗΣ

Εισαγωγή

Η μηλονική διαλδεΐδη αποτελεί προϊόν οξείδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τα ενεργά ενδιάμεσα οξυγόνου, επομένως αποτελεί δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης και οξειδωτικού στρες.

Τα επίπεδα της MDA προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά στα 586 nm και εκφράστηκαν σε micromolar (μM). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην αντίδραση της μηλονικής διαλδεΐδης με το χρωμογόνο αντιδραστήριο N-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδόλιο. Συγκεκριμένα, 1 μόριο MDA αντιδρά με 2 μόρια N-μεθυλ-2-φαινυλινδολίου προς το σχηματισμό ένα σταθερού έγχρωμου προϊόντος, με μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 586nm.

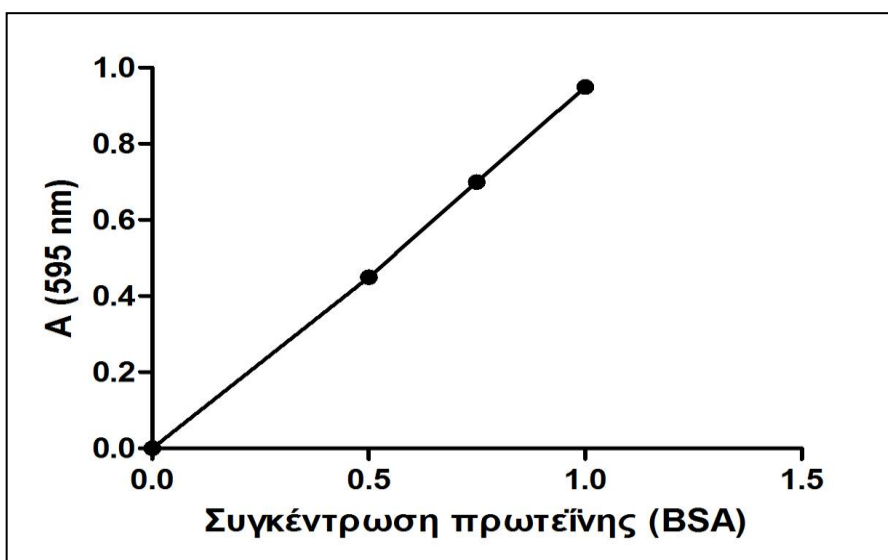


Σχήμα 3.11 . Η αντίδραση της MDA με το N-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδόλιο προς την παραγωγή χρωμοφόρου προϊόντος.⁹⁴

Περιγραφή μεθόδου

1. Από τα φυλαγόμενα δείγματα καρωτιδικών πλακών στους -80°C , λήφθηκε ποσότητα για ομογενοποίηση.
2. Ζυγίστηκε το κομμάτι της καρωτιδικής πλάκας και προστέθηκε Tris Buffer pH-7.4. Για κάθε 1mg ιστού, προστέθηκαν 10μl buffer.
3. Έπειτα σε ειδικό μηχάνημα έγινε ομογενοποίηση του ιστού.
4. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 3.500 στροφές για 10 λεπτά, στους 4°C .
5. Από το υπερκείμενο υγρό λήφθηκαν 200μl (το υπόλοιπο φυλάχθηκε στους -80°C) και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

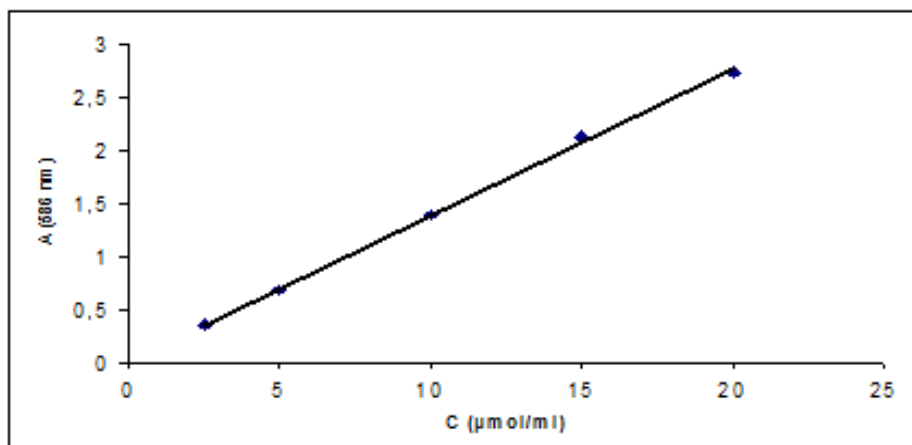
6. Παρασκευάστηκε το διάλυμα beaker 10.3 mM: 0.106 gr 1-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδολίου προστέθηκαν σε 50m³ ακετονιτρίλιο.
7. Προστέθηκαν 650μl διαλύματος beaker 10.3 mM στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν τον ομογενοποιημένο ιστό.
8. Προστέθηκαν 150μl HCL 12N. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και ανακινήθηκαν σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα.
9. Το υδατόλουτρο ρυθμίστηκε στους 45°C.
10. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο για 1 ώρα.
11. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρθηκαν από το υδατόλουτρο σε πάγο για 5 min.
12. Η φυγόκεντρος ρυθμίστηκε στους 4 °C, 3500rpm, 15 min και φυγοκεντρήθηκαν οι δοκιμαστικοί σωλήνες.
13. Τα δείγματα εξήχθησαν ήπια από τη φυγόκεντρο προς αποφυγή ανάμιξης υπερκείμενου-ιζήματος. Το υπερκείμενο υγρό των δοκιμαστικών σωλήνων φασματοφωτομετρήθηκε σε UV spectrophotometer στα 586 nm.
14. Έπειτα έγινε προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα .
15. Λήφθηκαν 5μl από το υπερκείμενο υγρό το οποίο είχε φυλαχθεί στους -80°C
16. Προστέθηκαν 45μl Tris Buffer pH=7.4 και έγινε ανάδευση με πιπετάρισμα.
17. Από το διάλυμα αυτό λήφθηκαν 10μl και προστέθηκαν 90μl ddH₂O.
18. Επίσης προστέθηκε επιπλέον 1ml από ένα διάλυμα σύστασης ddH₂O και αντιδραστηρίου Bradford σε αναλογία 4:1.



Σχήμα 3.12. Καμπύλη αναφοράς για τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης

Από την καμπύλη αναφοράς προέκυψε η εξίσωση:

$$y = 0.0169 (\pm 0.0325) + 0.1377 (\pm 0.0026)x, R^2 = 0.9988$$



Σχήμα 3.13. Καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της MDA.

19. Το κάθε δείγμα αναδεύτηκε με vortex και η απορρόφηση της πρωτεΐνης μετρήθηκε στα 595nm.
20. Βάσει καμπυλών αναφοράς που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας οι τιμές των απορροφήσεων της MDA και της πρωτεΐνης επεξεργάστηκαν για να προσδιοριστούν οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις ως εξής:
$$C_{MDA} = (\text{Absorption} * 5) / 0.1263$$
$$C_{\text{Protein}} = (\text{Absorption} - 0.073) / 0.042$$
21. Με περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mol MDA προς mg πρωτεΐνης και απεικονίστηκαν με ιστόγραμμα.

4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κατά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του Western Blot, τελικός μας στόχος ήταν να εξεταστεί εάν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ενεργοποίηση και την έκφραση της eNOS και της Akt στους ασθενείς, όταν αυτοί χωριστούν σε δυο ομάδες. Η μια ομάδα είχε ως παράμετρο τη λήψη ή όχι στατινών και η δεύτερη ομάδα τη σταθερότητα της αθηρωματικής τους πλάκας.

Αρχικά οι επαναλαμβανόμενες μετρήσεις των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα συγκρίθηκαν μεταξύ τους με ανάλυση διασποράς (ANOVA) σε συνδυασμό με Turkey's multiple comparison. Για τα τελικά αποτελέσματα, όπου θέλαμε να εξετάσουμε τα δεδομένα βάσει των δυο ομάδων που αναφέρθηκαν παραπάνω, έγινε μη παραμετρική δοκιμή (unpaired two-tailed test), με δοκιμασία Mann Whitney.

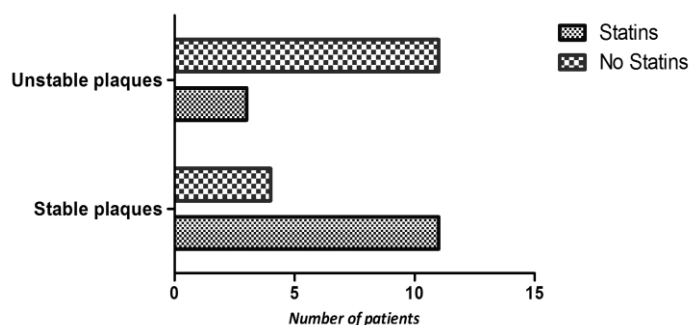
Οι μετρήσεις της MDA εξετάστηκαν και αυτές με τη σειρά τους ως προς τις δυο ομάδες. Χρησιμοποιήθηκε και εδώ μη παραμετρική δοκιμή (unpaired two-tailed test), με δοκιμασία Mann Whitney.

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPS και η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε ως $p < 0.05$.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παθολογοανατομικά ευρήματα

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις του παθολογοανατόμου από τα 29 δείγματα που αξιολογήθηκαν τα 14 είχαν ασταθή αθηρωματική πλάκα και τα 15 σταθερή. Επιπρόσθετα σε αυτή την παρατήρηση σημειώνεται ότι από τους 14 ασθενείς που λάμβαναν στατίνη, οι 11 είχαν σταθερή αθηρωματική πλάκα ενώ οι 3 ασταθή. Επίσης από τους 15 ασθενείς οι οποίοι δεν έπαιρναν στατίνη, οι 11 είχαν ασταθή αθηρωματική πλάκα ενώ οι 4 είχαν σταθερή.



Σχήμα 4.1. Ραβδόγραμμα κατανομής ασθενών

Western blot analysis

Τα αποτελέσματα από την τεχνική Western blot παρατίθενται παρακάτω. Οι φωτογραφίες από τα φιλμ επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Gel Pro Analyzer .

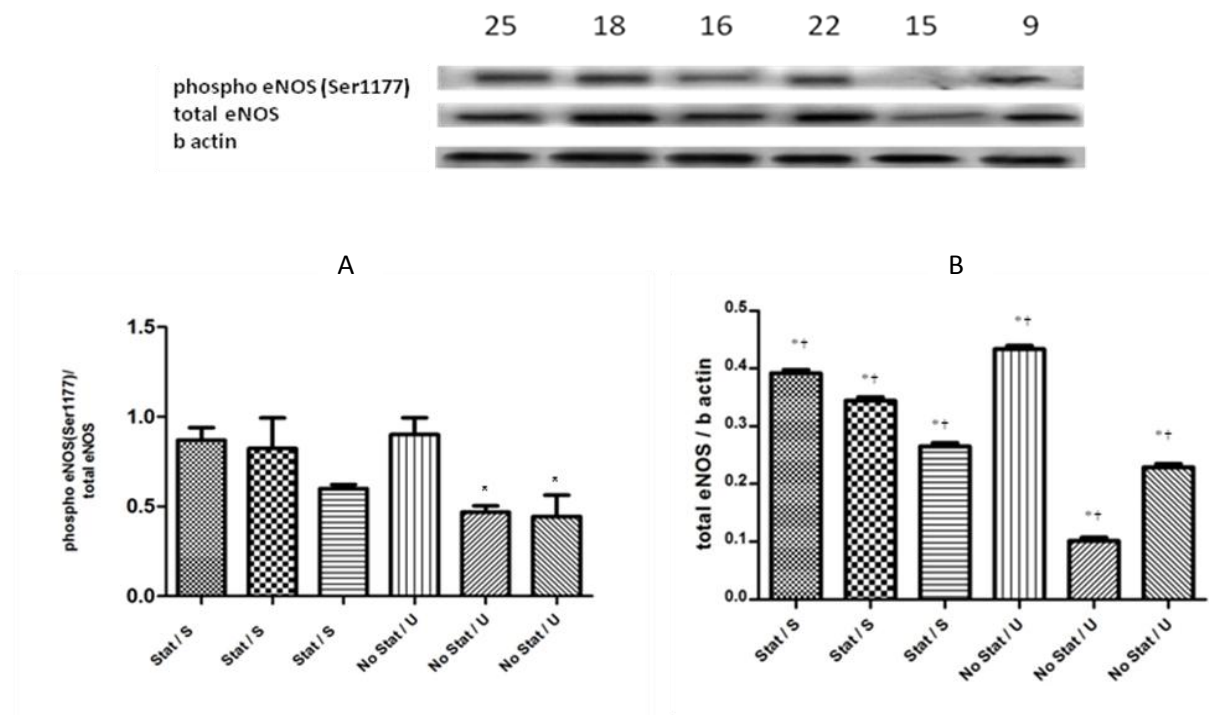
Οι συντομογραφίες που φαίνονται στα διαγράμματα είναι οι εξής:

Stat: ασθενής που λάμβανε στατίνη

No Stat: ασθενής που δεν λάμβανε στατίνη

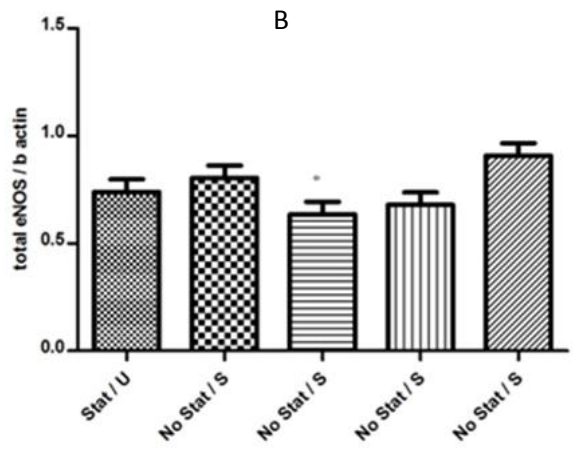
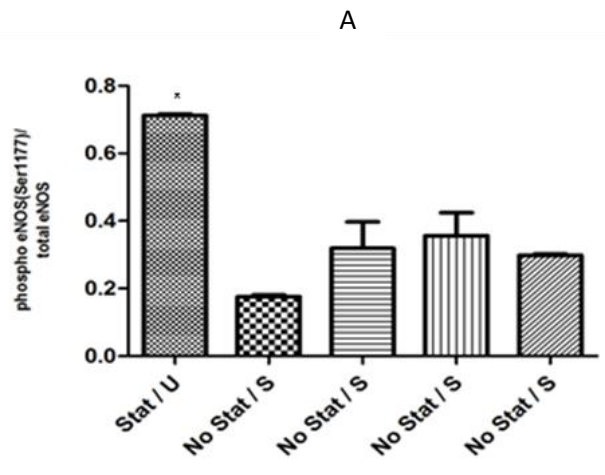
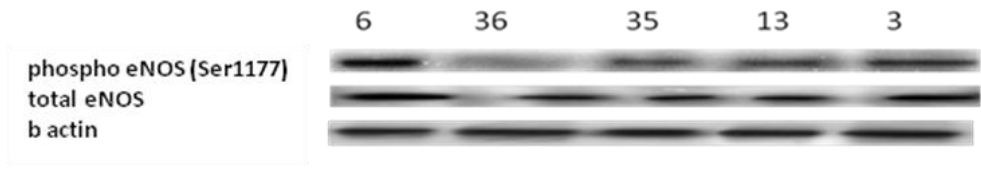
S: σταθερή αθηρωματική πλάκα

U: ασταθής αθηρωματική πλάκα

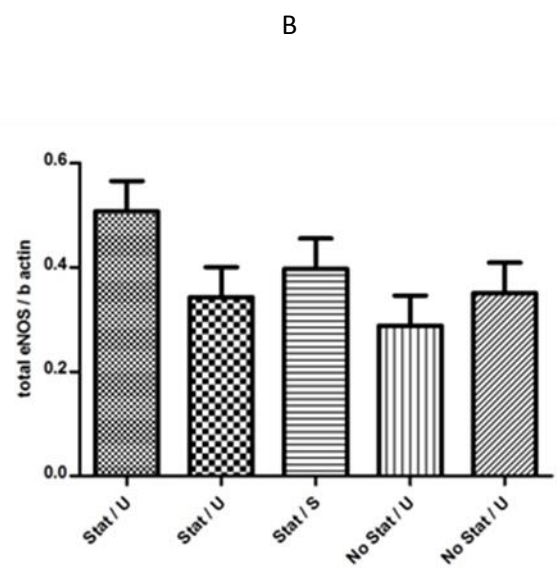
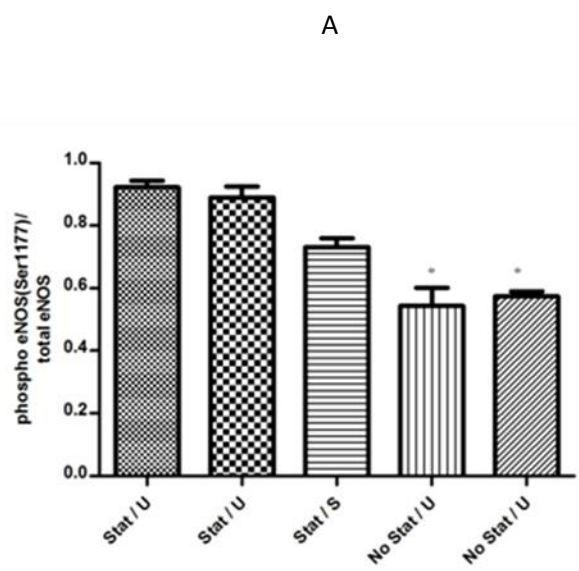
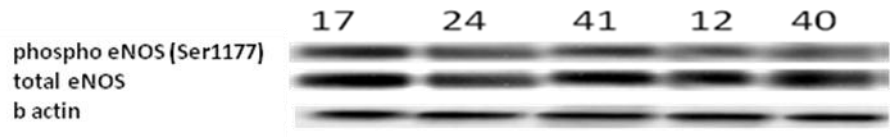


Σχήμα 4.2 .Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών A:peNOS/teNOS

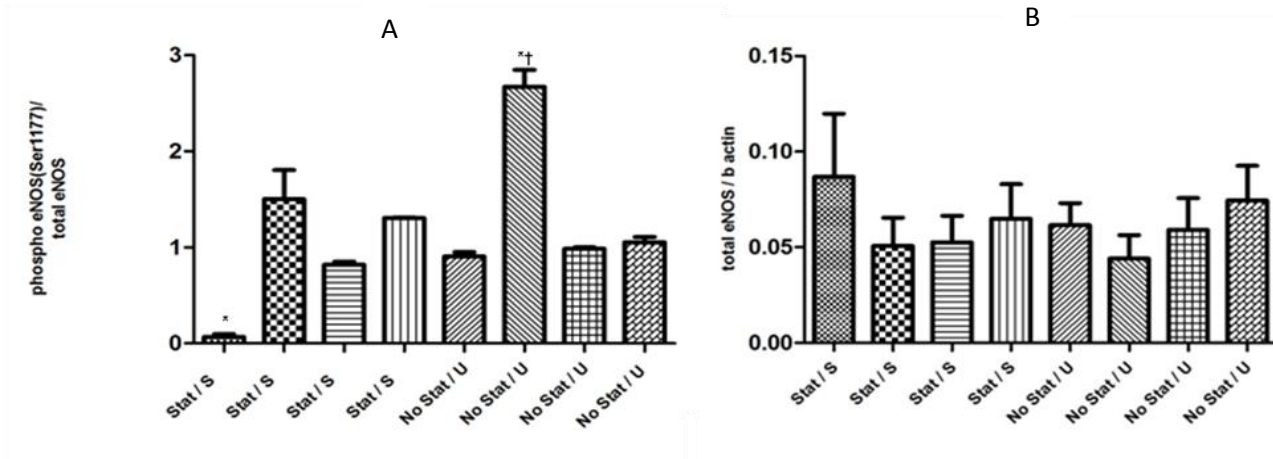
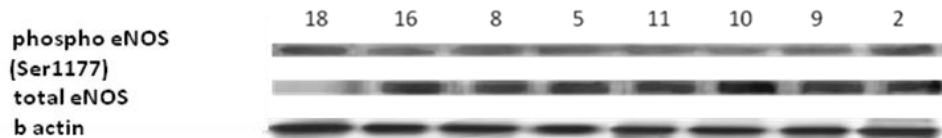
* $p < 0.05$ vs 25,18,16,22 B:teNOS/b actin * $p < 0.05$



Σχήμα 4.3. .Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών A:peNOS/teNOS * $p < 0.05$ vs 36,35,13,3 B:teNOS/b actin * $p < 0.05$ vs 6,36,13,3

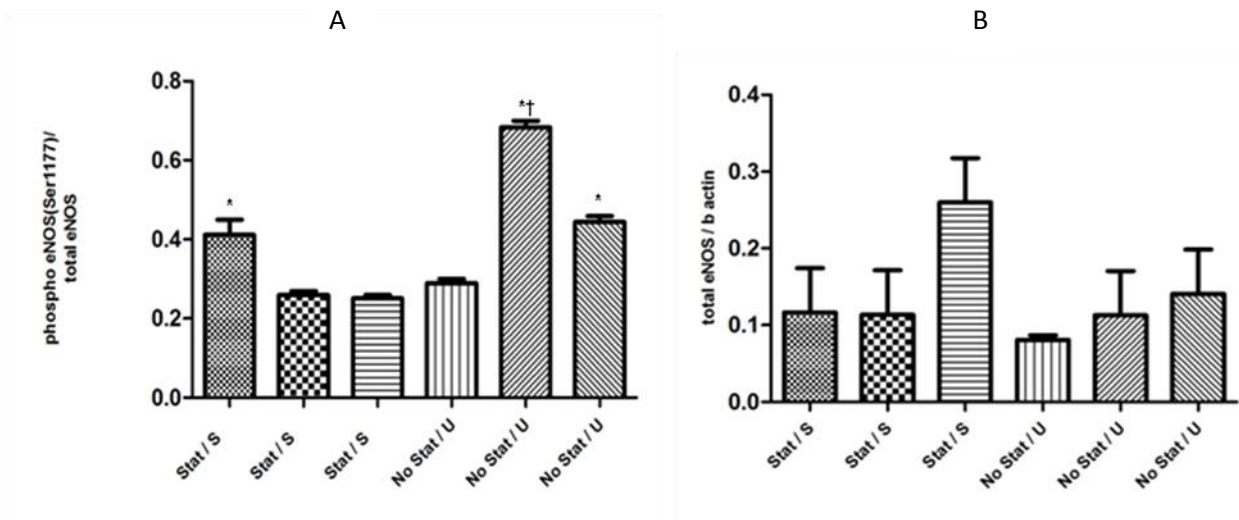
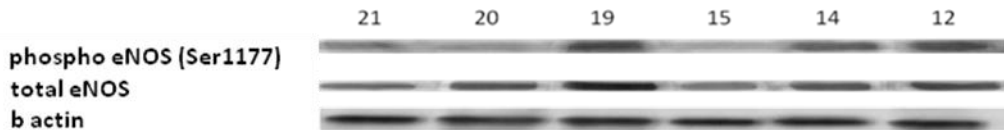


Σχήμα 4.4. .Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών A:peNOS/teNOS * $p < 0.05$ vs 17,24,41 B:teNOS/b actin



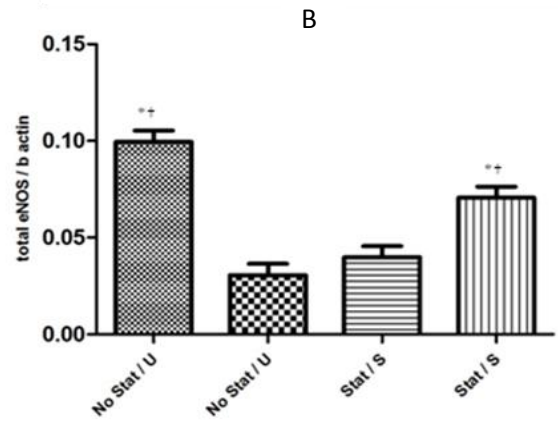
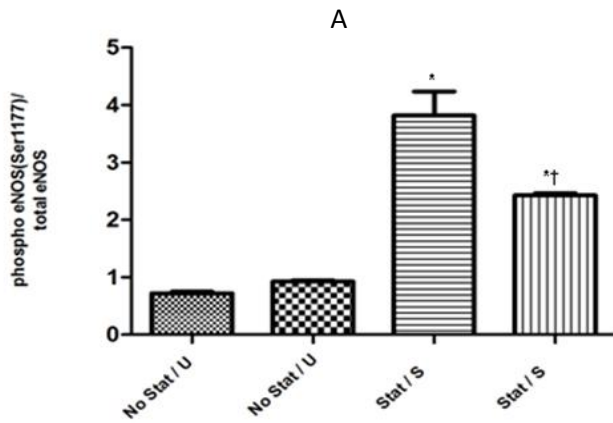
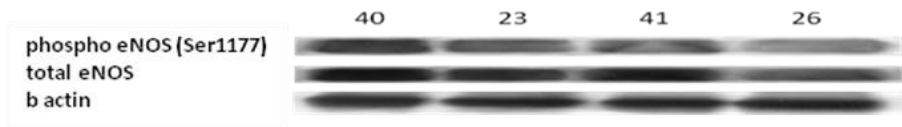
Σχήμα 4.5. Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών A: *peNOS/teNOS*

* $p < 0.05$ vs 18,16,8,5,11,9,2 B: *teNOS/b actin*

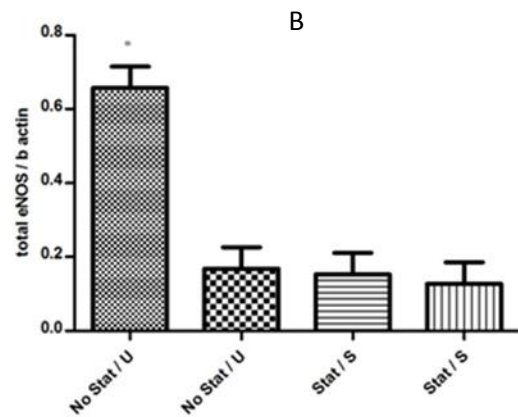
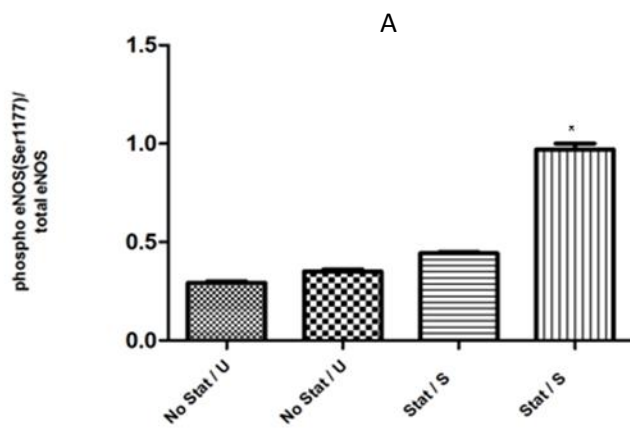
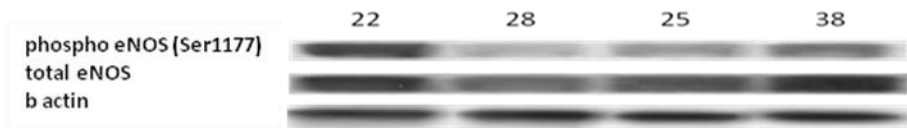


Σχήμα 4.6. Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών A: *peNOS/teNOS*

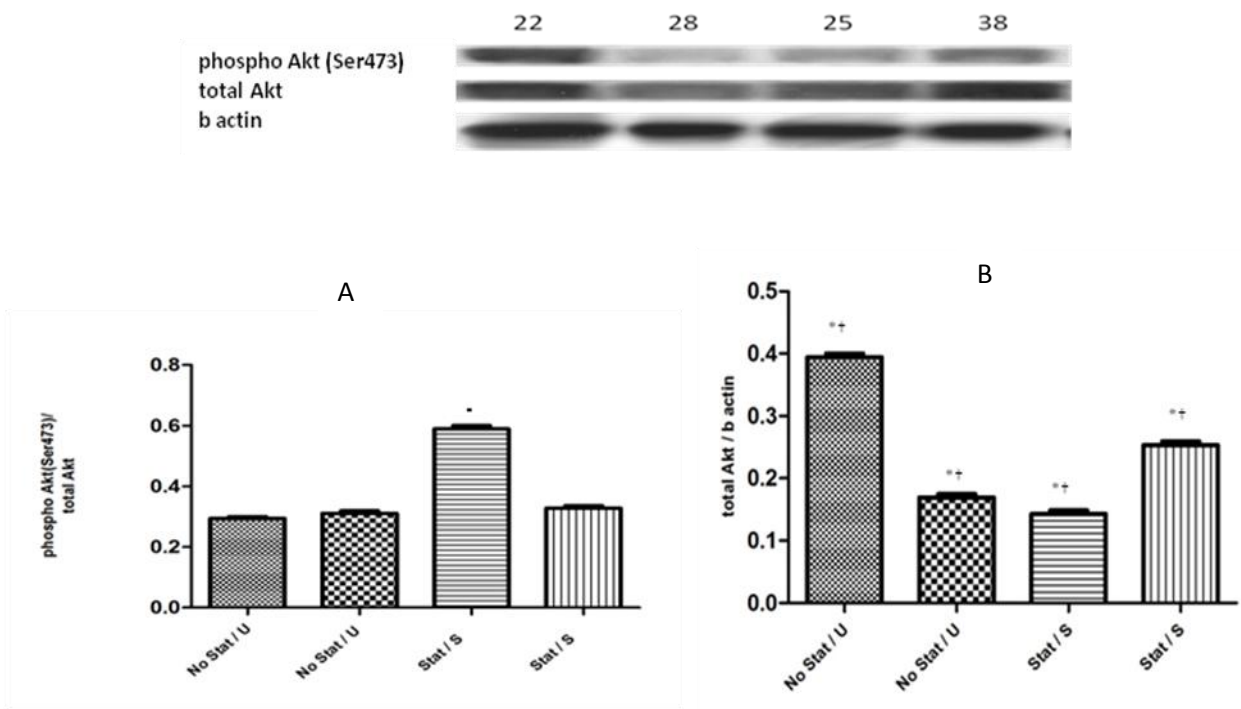
* $p < 0.05$ vs 21,20,19,15,12 B: *teNOS/b actin*



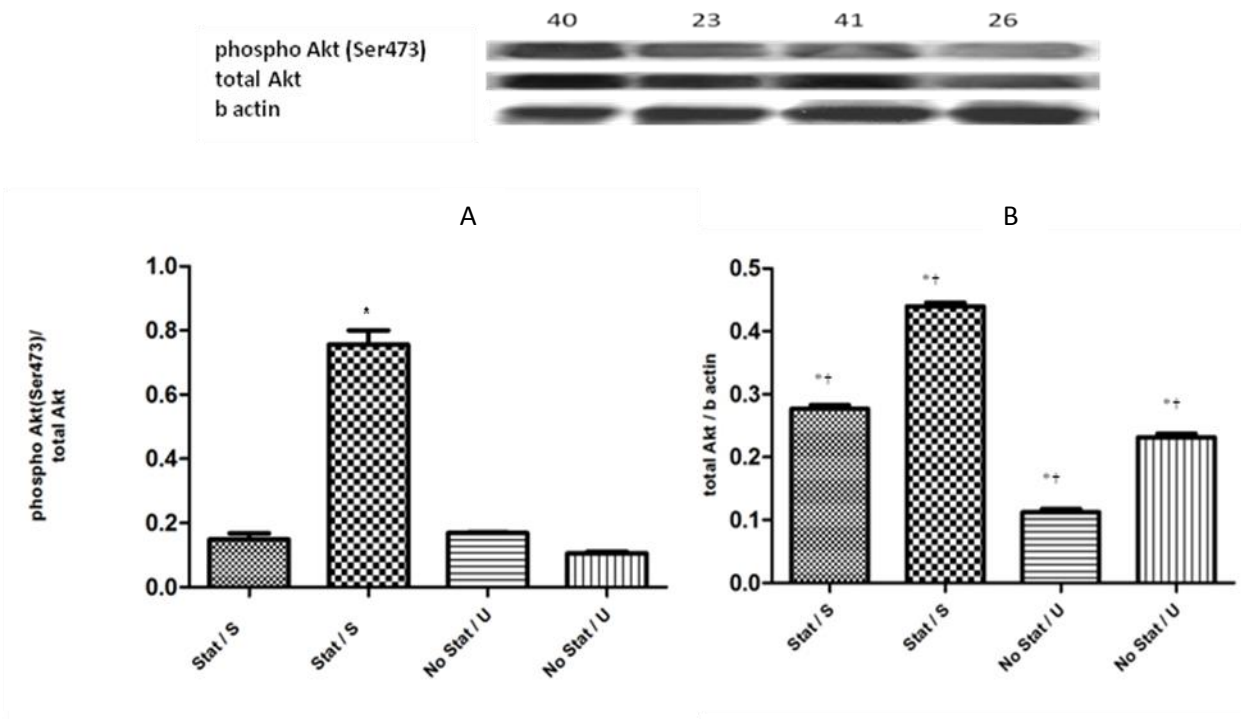
Σχήμα 4.7. Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών A:peNOS/teNOS * $p < 0.05$ vs 40,23,41 B:teNOS/b actin * $p < 0.05$ vs 40,23,41



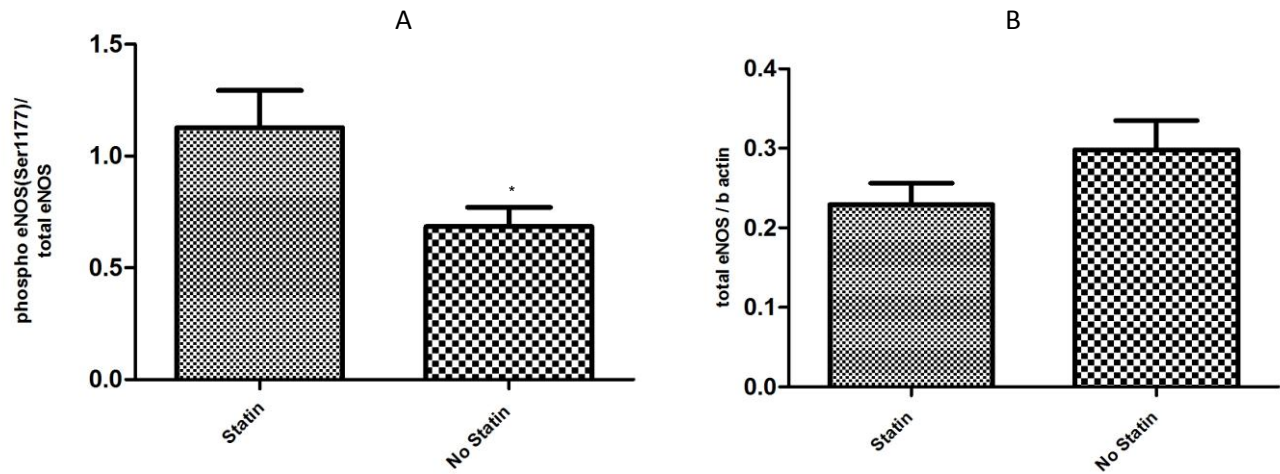
Σχήμα 4.8. Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών A:peNOS/teNOS * $p < 0.05$ vs 22,28,25 B:teNOS/b actin * $p < 0.05$ vs 28,25,38



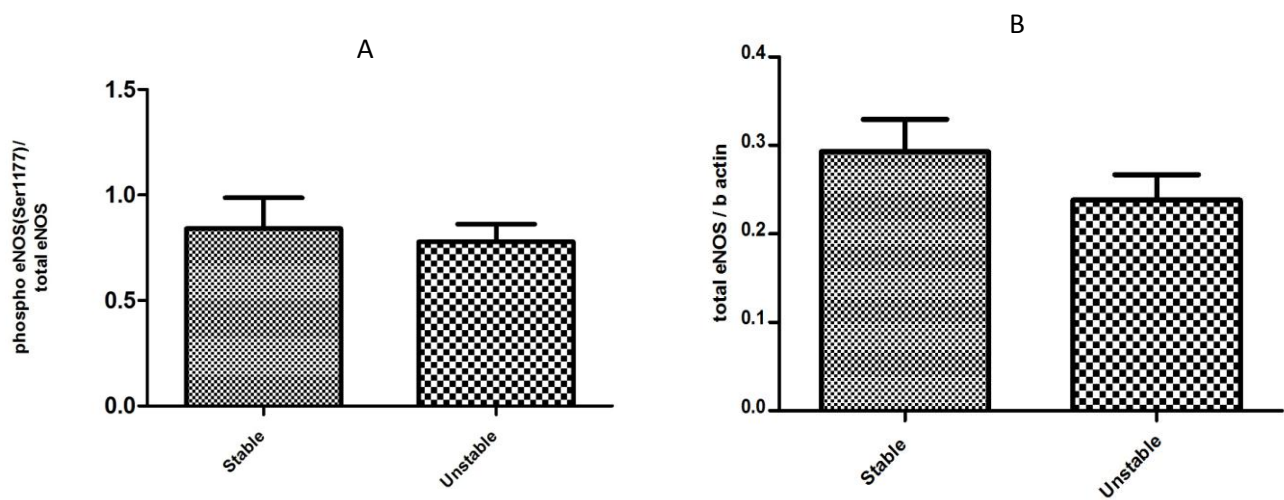
Σχήμα 4.9. Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών A:pAkt/tAkt * $p < 0.05$ vs 22,28,38 B:tAkt/b actin * $p < 0.05$ vs 22,28,25,38



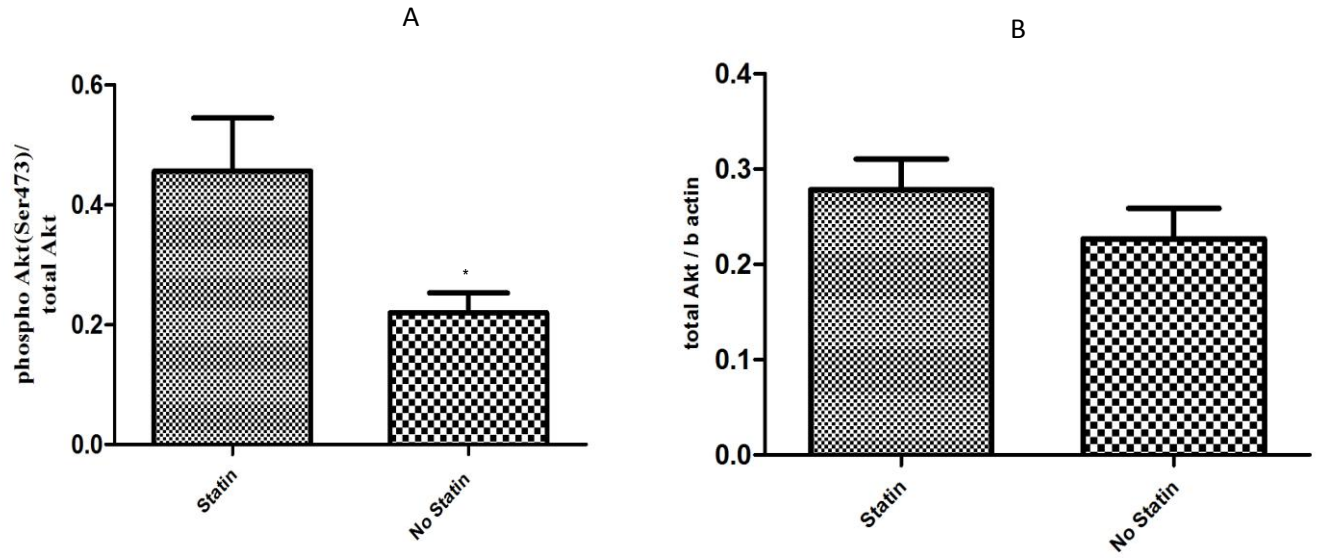
Σχήμα 4.10. Χαρακτηριστική εικόνα Western Blot και ιστόγραμμα των καρωτιδικών πλακών A:pAkt/tAkt * $p < 0.05$ vs 40,41,26 B:tAkt/b actin * $p < 0.05$ vs 40,23,41,26



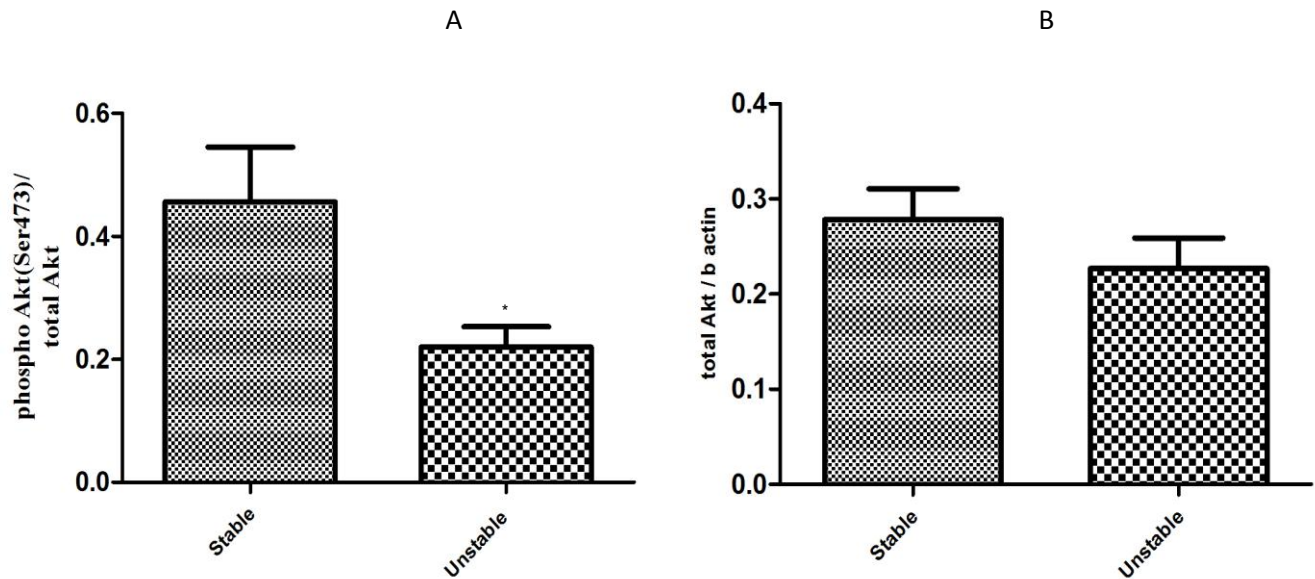
Σχήμα 4.11. Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων ως προς τη λήψη στατινών ή όχι A: peNOS/teNOS * $p < 0.05$ vs Statin B: teNOS/b actin.



Σχήμα 4.12. Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων ως προς τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας A: peNOS/teNOS B: teNOS/b actin.



Σχήμα 4.13. Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων ως προς τη λήψη στατινών ή όχι A:pAkt/tAkt * $p < 0.05$ vs Statin B:tAkt/b actin.



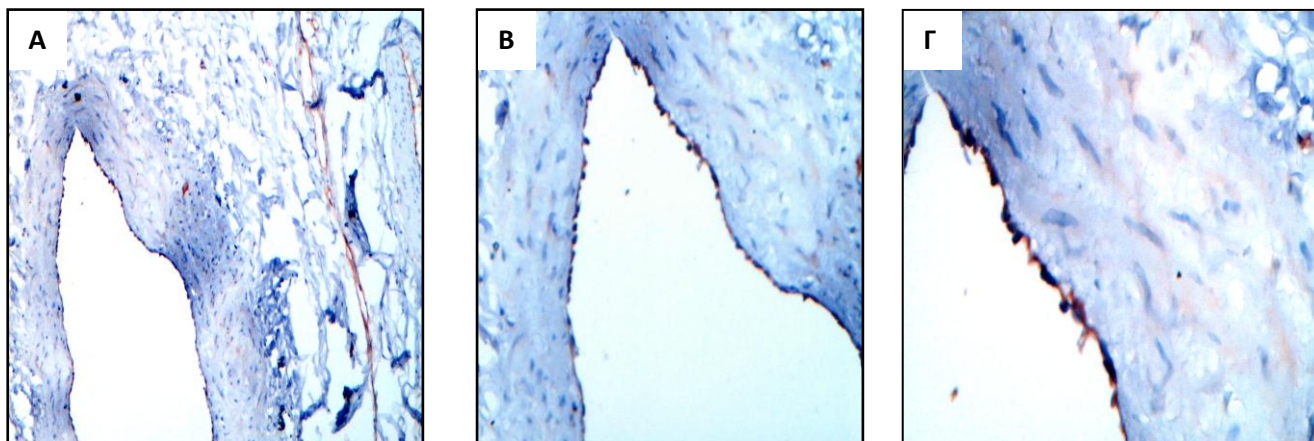
Σχήμα 4.14. Ιστόγραμμα συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων ως προς τη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών A:pAkt/tAkt * $p < 0.05$ vs Stable B:tAkt/b actin.

Ανοσοϊστοχημεία

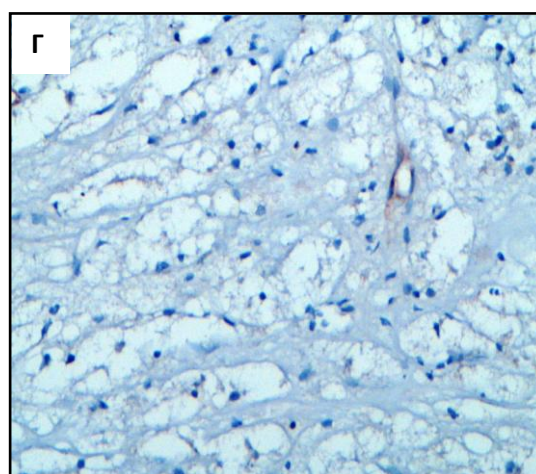
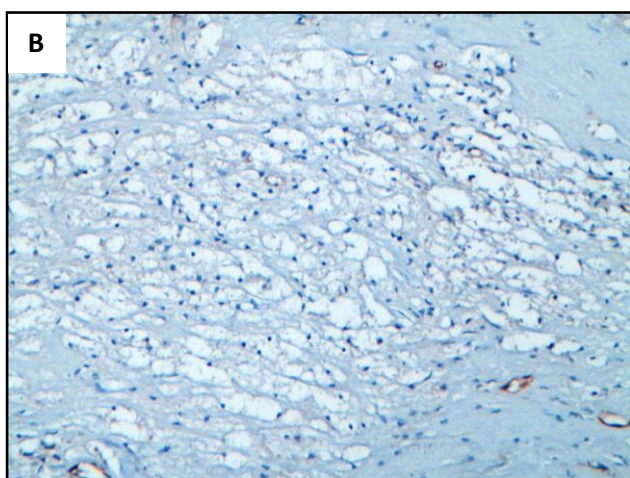
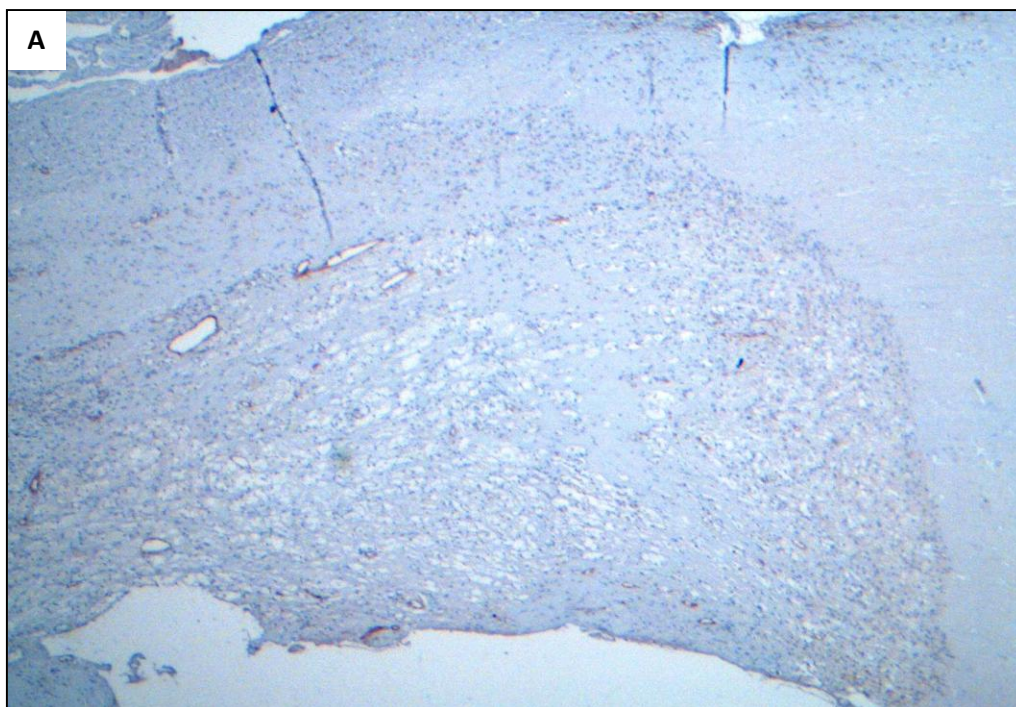
Στις αθηρωματικές καρωτιδικές πλάκες η ένταση της ανοσοχρώσης και επομένως της έκφρασης της eNOS εντοπίζεται σε διάφορα σημεία της πλάκας. Η έκφραση της eNOS εντοπίζεται κυρίως εντός των τοιχωμάτων της αθηρωματικής πλάκας, σε αφρώδη κύτταρα. Επίσης παρατηρείται ανοσοχρώση στα επιθηλιακά κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου καθώς και στα λεία μυϊκά κύτταρα που περιβάλλουν την αθηρωματική πλάκα. Ως αρνητική ή εξασθενημένη ανοσοχρώση χαρακτηρίζει μια πλάκα όταν δεν υπάρχει ανοσοχρώση σε κανένα από τα κύτταρα τα οποία αναφέρθηκαν παραπάνω ή εάν υπάρχει είναι αμυδρή. Αντίθετα χαρακτηρίζεται με έντονη χρώση όταν υπάρχει διάχυτη ανοσοχρώση eNOS μέσα στην αθηρωματική πλάκα αλλά και στο τοίχωμα γύρω από αυτή. Οι εικόνες των αποτελεσμάτων που παρατίθενται παρακάτω είναι χαρακτηριστικές της διαβάθμισης της έκφρασης της eNOS στους διαφορετικούς ιστούς.

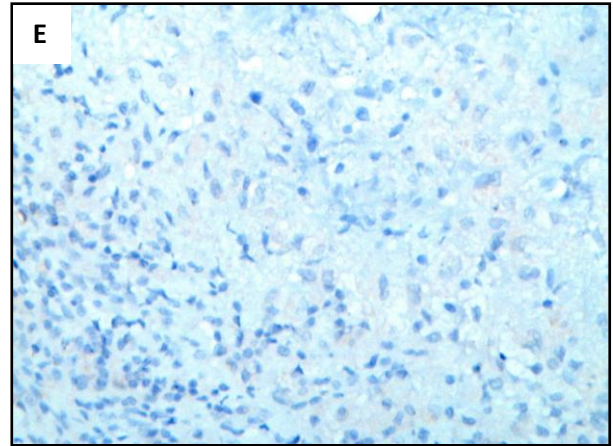
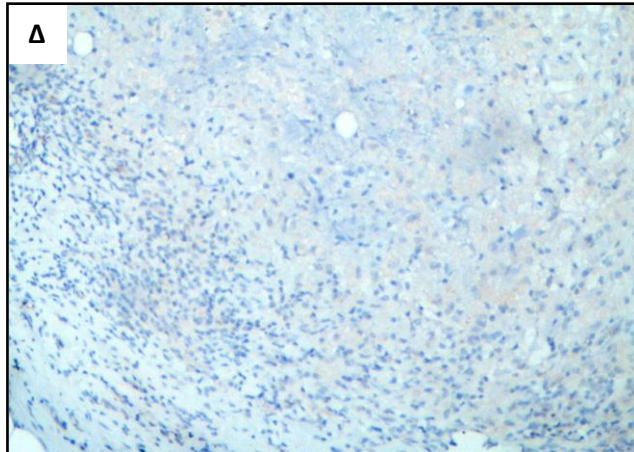
Δείγματα από φυσιολογική αρτηρία θυρεοειδούς χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control) σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Η ανοσοχρώση είναι εμφανής στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγείου και των τροφοφόρων τριχοειδών. Υπάρχει θετική χρώση και στα λεία μυϊκά κύτταρα του μέσω χιτώνα.

Σχήμα 4.15. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της eNOS σε φυσιολογική αρτηρία θυρεοειδούς (control) με τη μέθοδο βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης και με χρωμογόνα διαμινοβενζιδίνη/ αιματοξυλίνη (μεγέθυνση: x100, x200, x400).

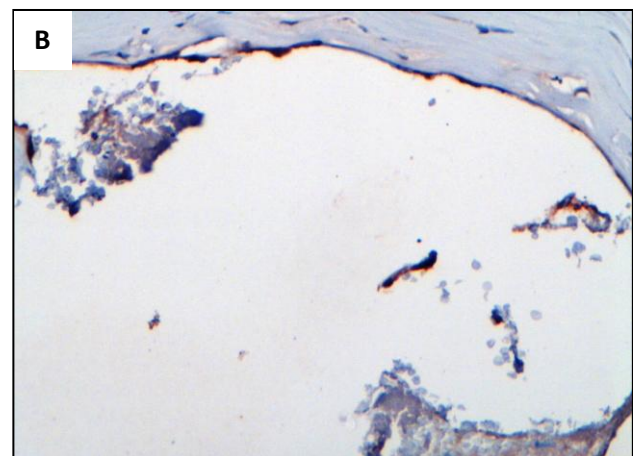
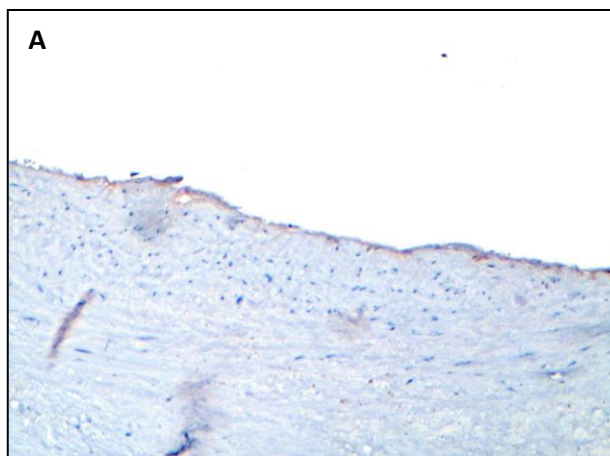


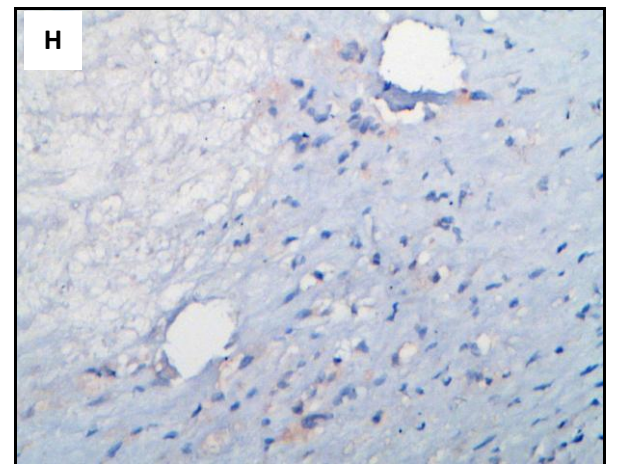
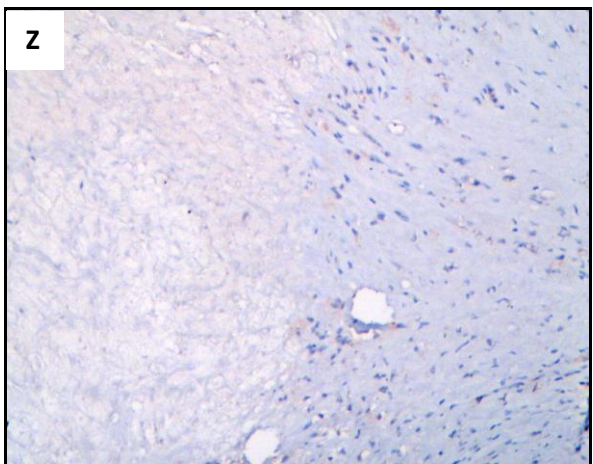
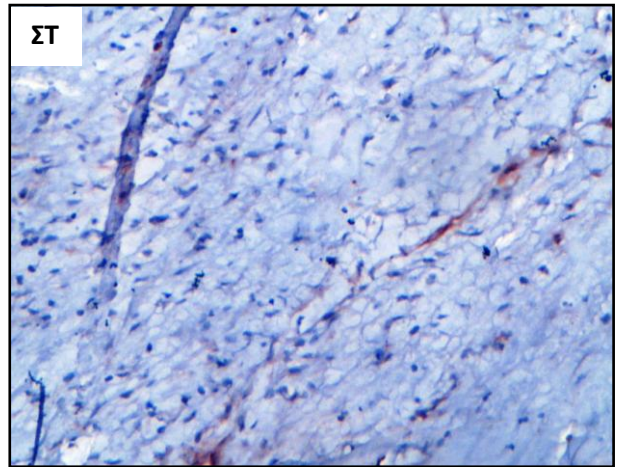
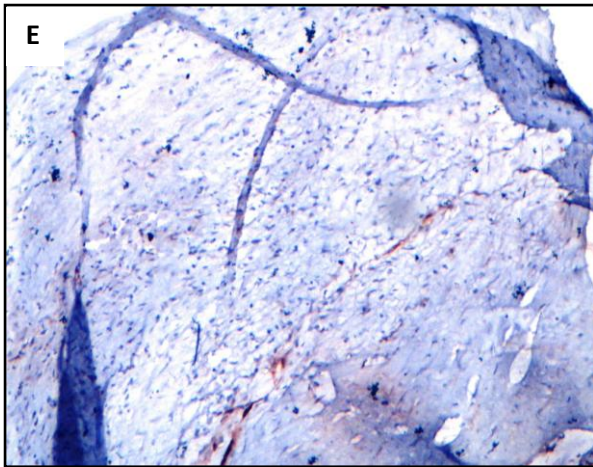
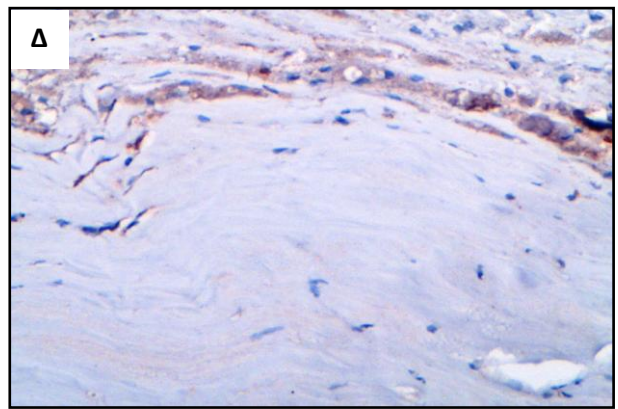
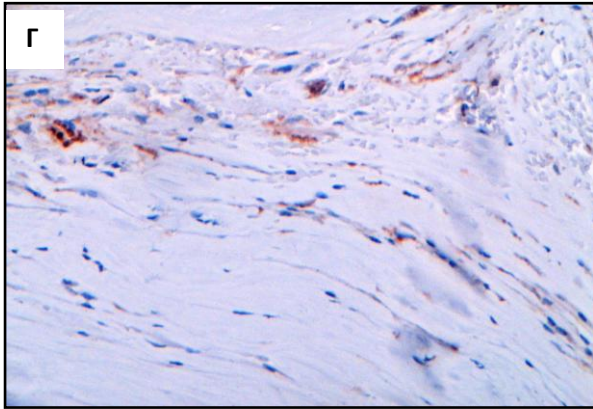
Σχήμα 4.16. Χαρακτηριστικές εικόνες εξασθενημένης [(faint (±)] ανοσοχρώσης eNOS με τη μέθοδο αιματοξυλίνης/ διαμινοβενζιδίνης (38). A: Αθηρωματική πλάκα διαγράφεται έντονα (μεγέθυνση: x25) B,Γ: Αφρώδη κύτταρα εντός της αθηρωματικής πλάκας με έντονη φλεγμονώδη διήθηση (μεγέθυνση: x100, x200) Δ, E: Παρατηρείται αυξημένη παρουσία λεμφοκυττάρων (μεγέθυνση: x100, x200)

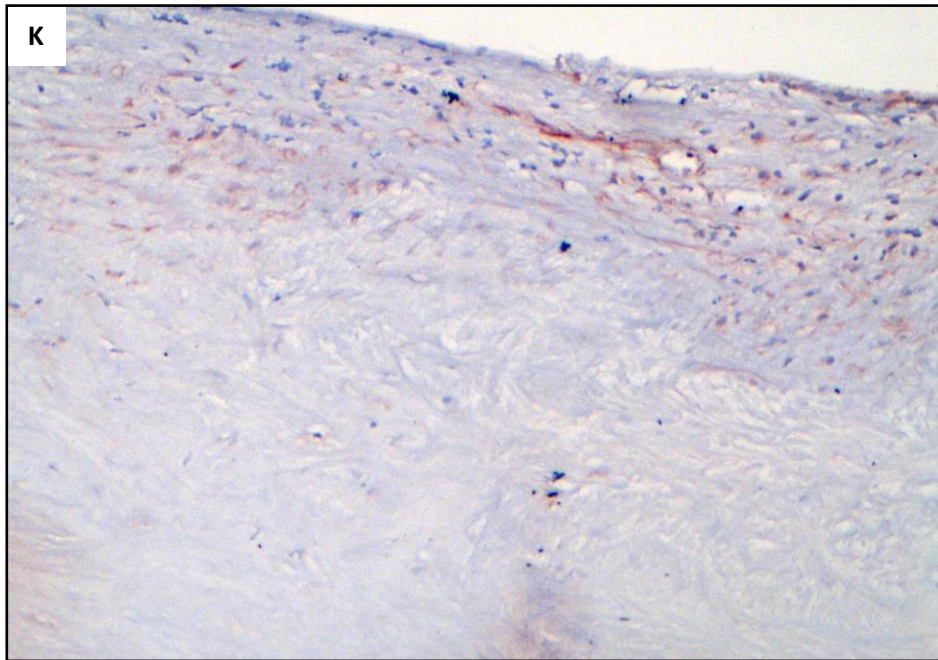
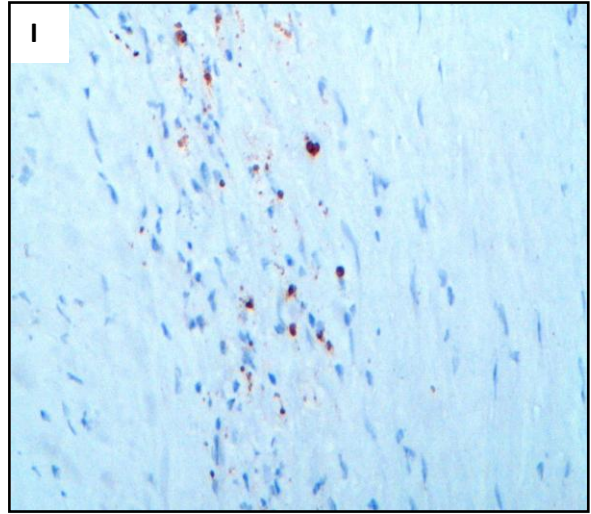
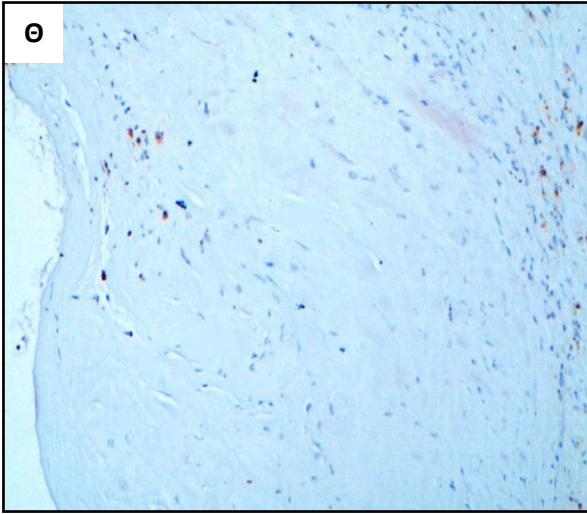




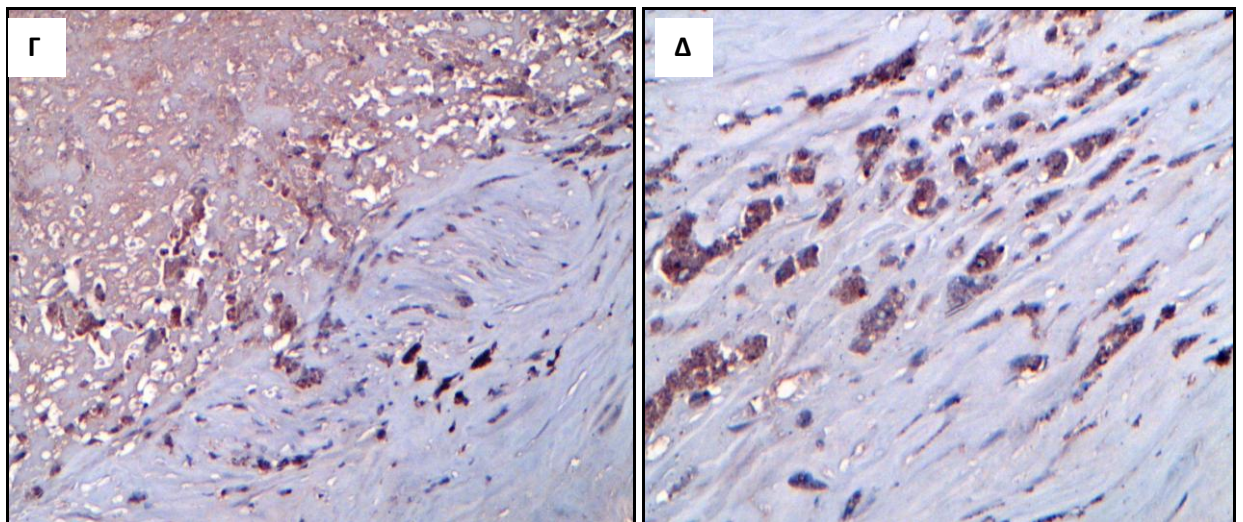
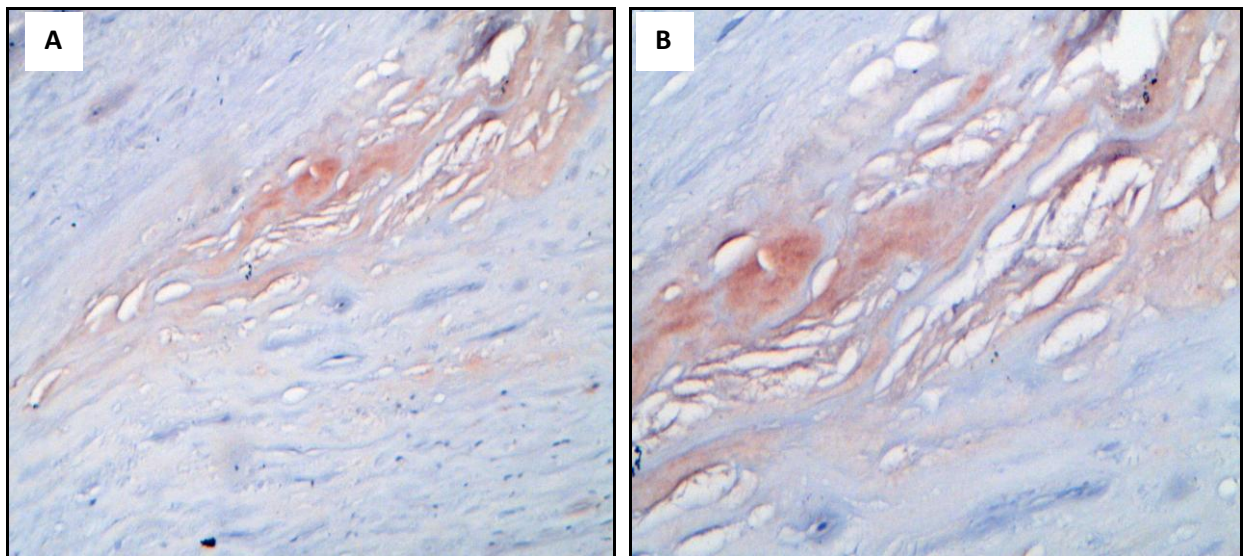
Σχήμα 4.17. Ασθενής [*weak (+)*] ανοσοχρώση eNOS με τη μέθοδο αιματοξυλίνης/ διαμινοβενζιδίνης. A,B: Παρατηρείται χρώση στην ενδοθηλιακή στιβάδα και ελαφρώς στα λεία μυϊκά κύτταρα του μέσου χιτώνα (12) (μεγέθυνση: x100, x200) Γ,Δ : Χρωματισμένα αφρώδη κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας. Απεικονίζονται η πλάκα και το τοίχωμα γύρω από την πλάκα (μεγέθυνση: x200) Ε,ΣΤ: Έντονη φλεγμονώδη διήθηση σε αναδιπλωμένο ιστό αθηρωματικής πλάκας (11) (μεγέθυνση: x100, x200) Ζ,Η: Απεικόνιση τμήματος αθηρωματικής πλάκας και λείων μυϊκών κυττάρων γύρω από αυτή (19) (μεγέθυνση: x100, x200) Θ,Ι: Χρωματισμένα αφρώδη κύτταρα εντός της αθηρωματικής πλάκας και λεία μυϊκά κύτταρα γύρω από αυτή (22) (μεγέθυνση: x100, x200) Κ: Έσω στιβάδα με χρώση στα λεία μυϊκά κύτταρα (μεγέθυνση: x100)

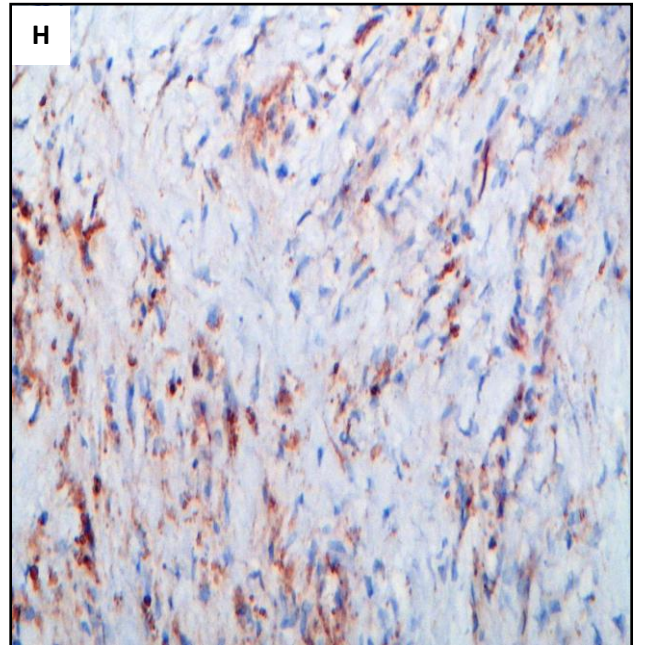
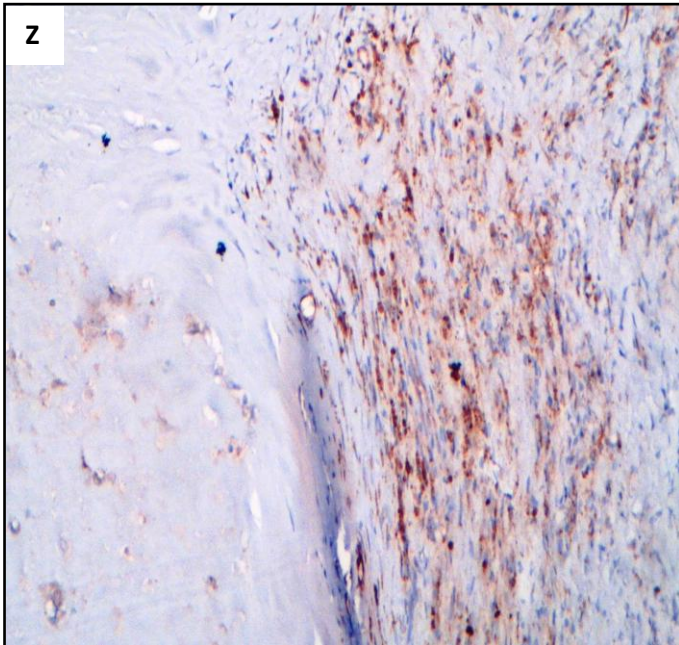
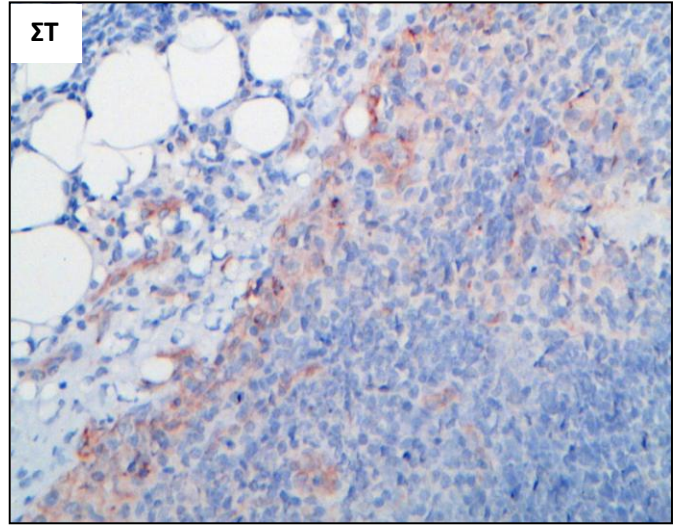
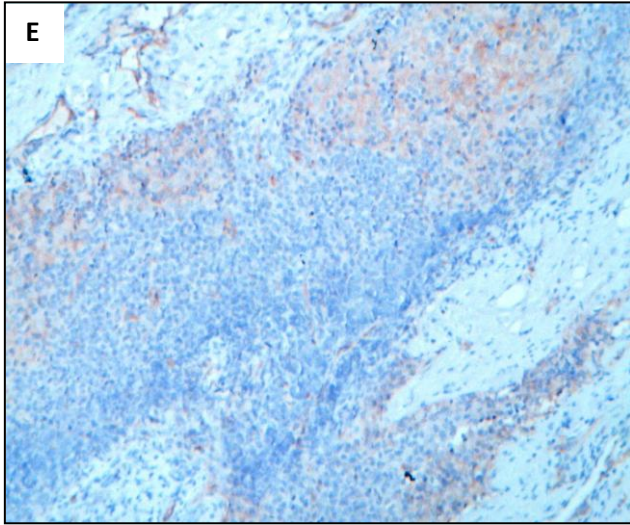


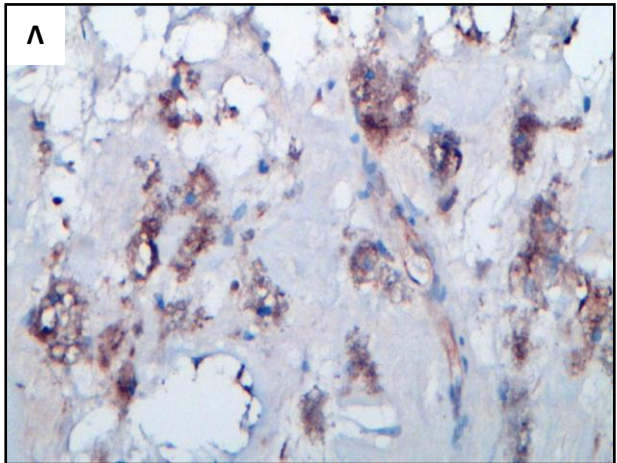
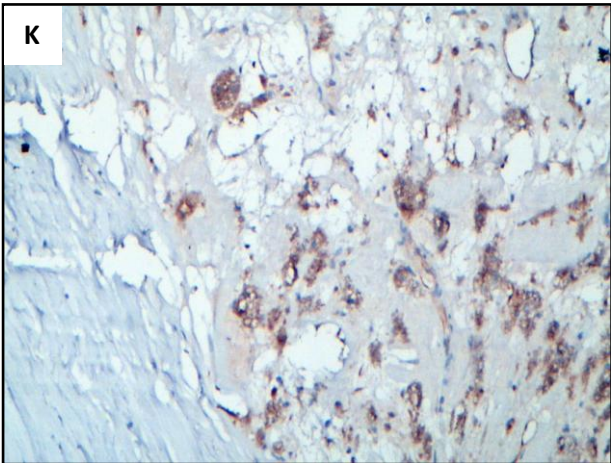
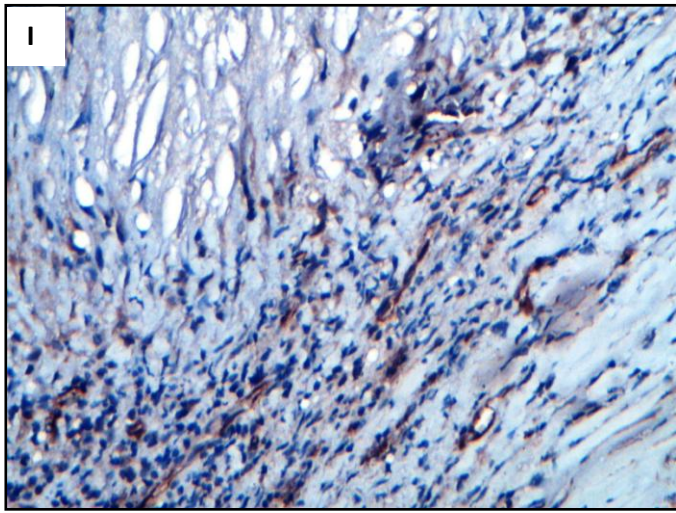
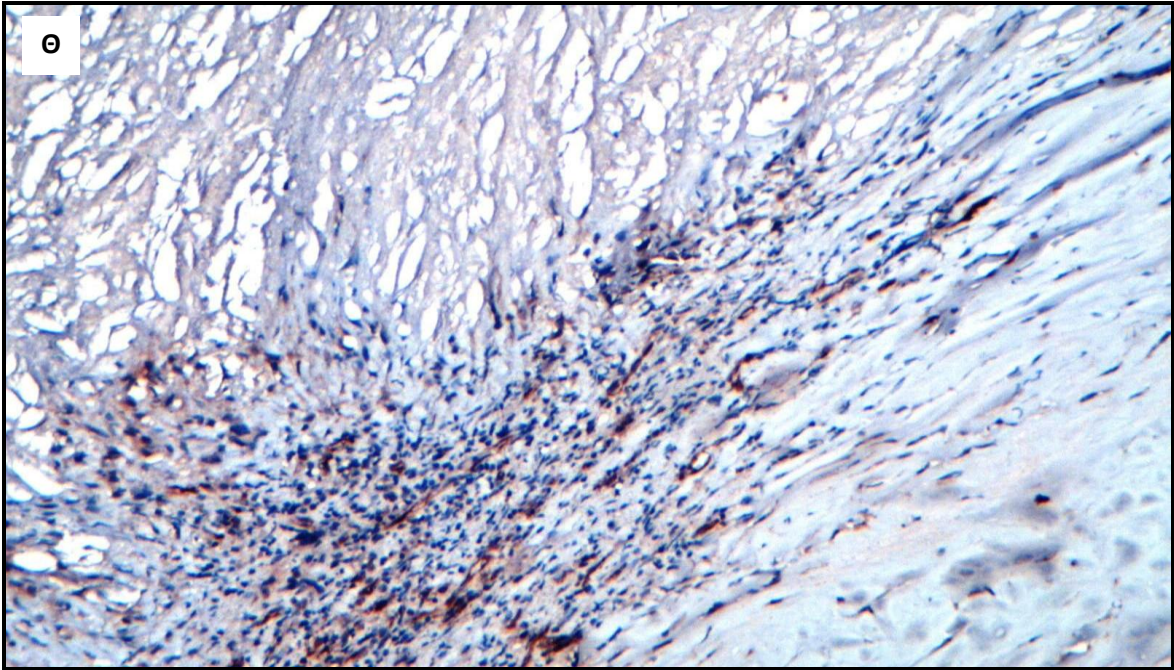




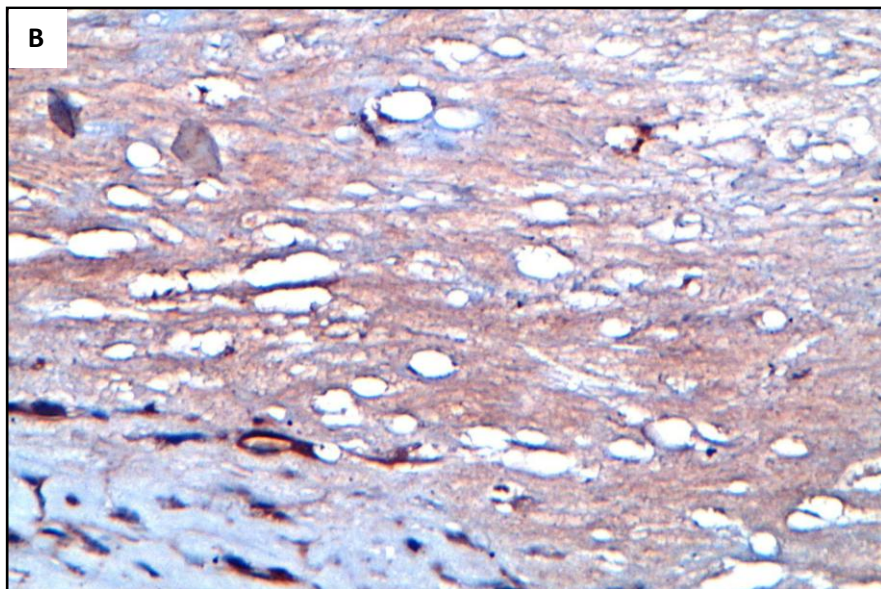
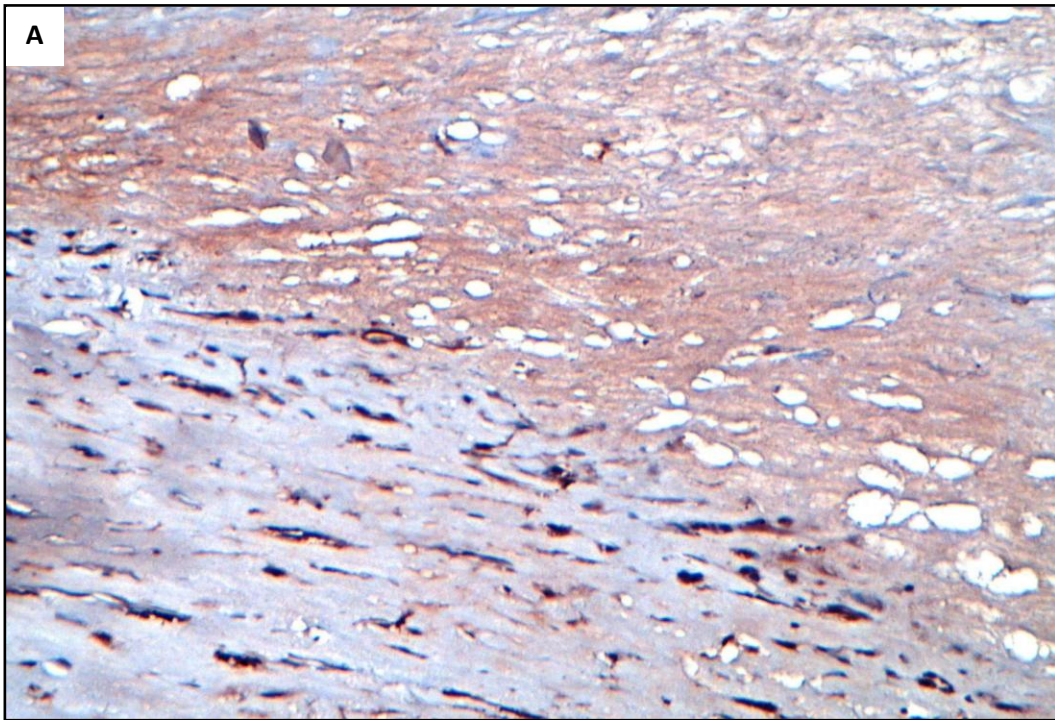
Σχήμα 4.18. Αντιπροσωπευτικές εικόνες μέτριας χρώσης [moderate(++)] της eNOS με τη μέθοδο αιματοξυλίνης/ διαμινοβενζιδίνης. Α,Β: Αφρώδη κύτταρα και κρύσταλλοι χοληστερόλης μέσα στην αθηρωματική πλάκα και λεία μυϊκά κύτταρα που περιβάλλουν την πλάκα (18) (μεγέθυνση: x100, x200). Γ,Δ: Τμήμα της πλάκας με έντονη ανοσοχρώση και λεία μυϊκά κύτταρα που την περιβάλλουν (24) (μεγέθυνση: x100, x200). Ε,ΣΤ: Έντονη παρουσία λεμφοκυττάρων σε φλεγμονώδη ιστό. Μεγάλα λιποκύτταρα στο σημείο της βλάβης (10) (μεγέθυνση: x100, x200). Ζ,Η: Μέτρια χρώση μέσα στα τοιχώματα της πλάκας (16) (μεγέθυνση: x100, x200)Θ,Ι: Κρύσταλλοι χοληστερόλης και μεγάλος αριθμός λεμφοκυττάρων υποδεικνύουν αυξημένη φλεγμονώδη διήθηση (6) (μεγέθυνση: x100, x200). Κ,Λ:

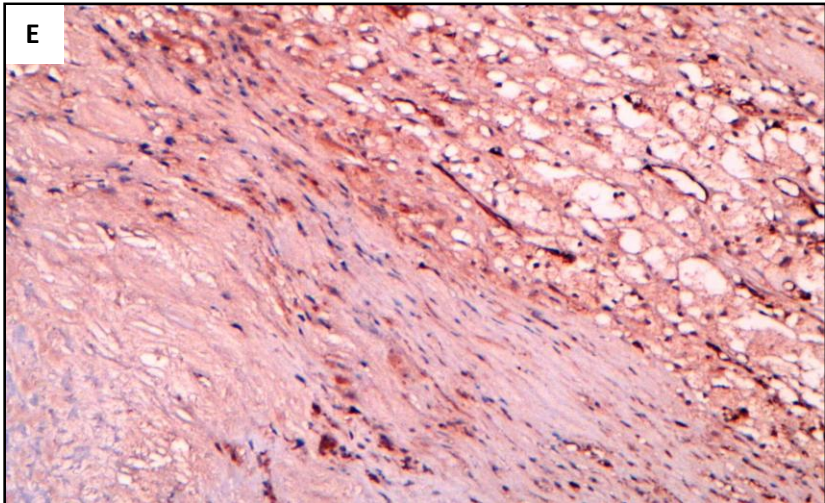
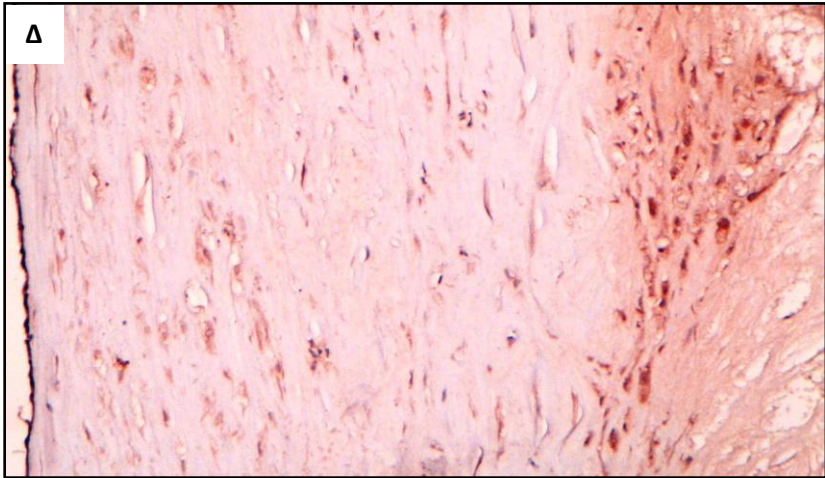
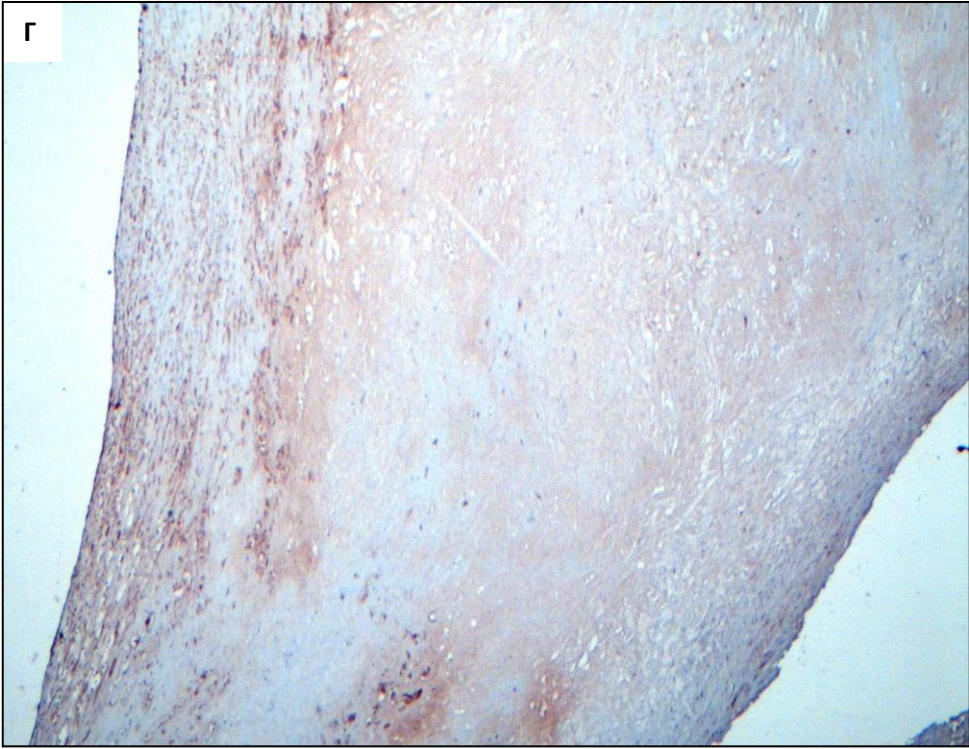


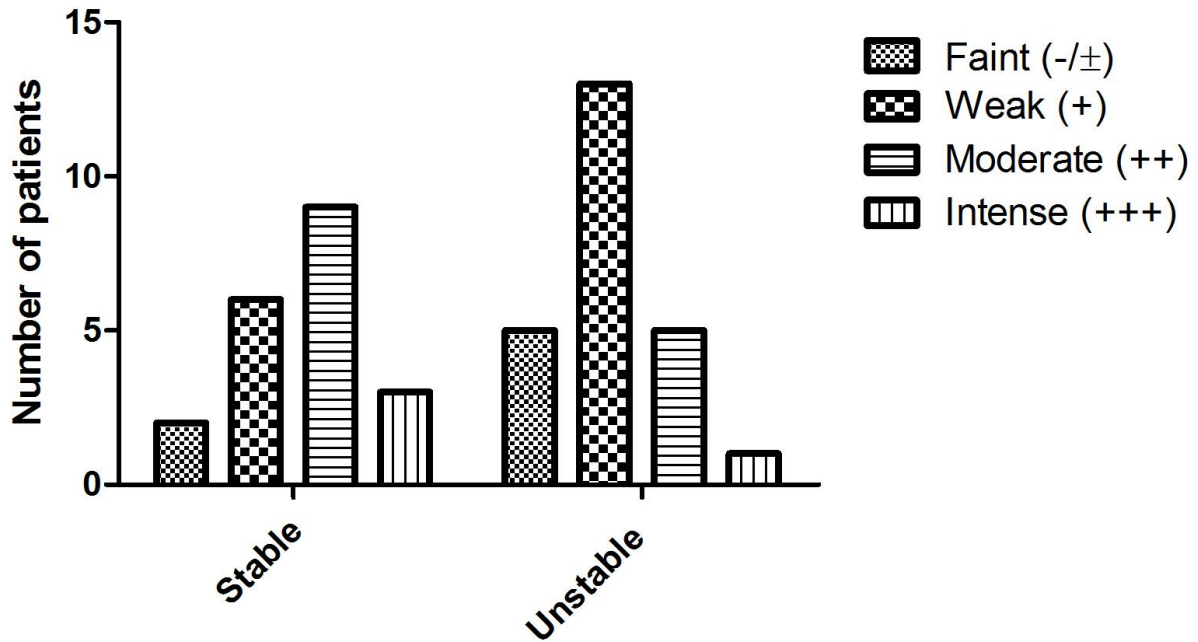




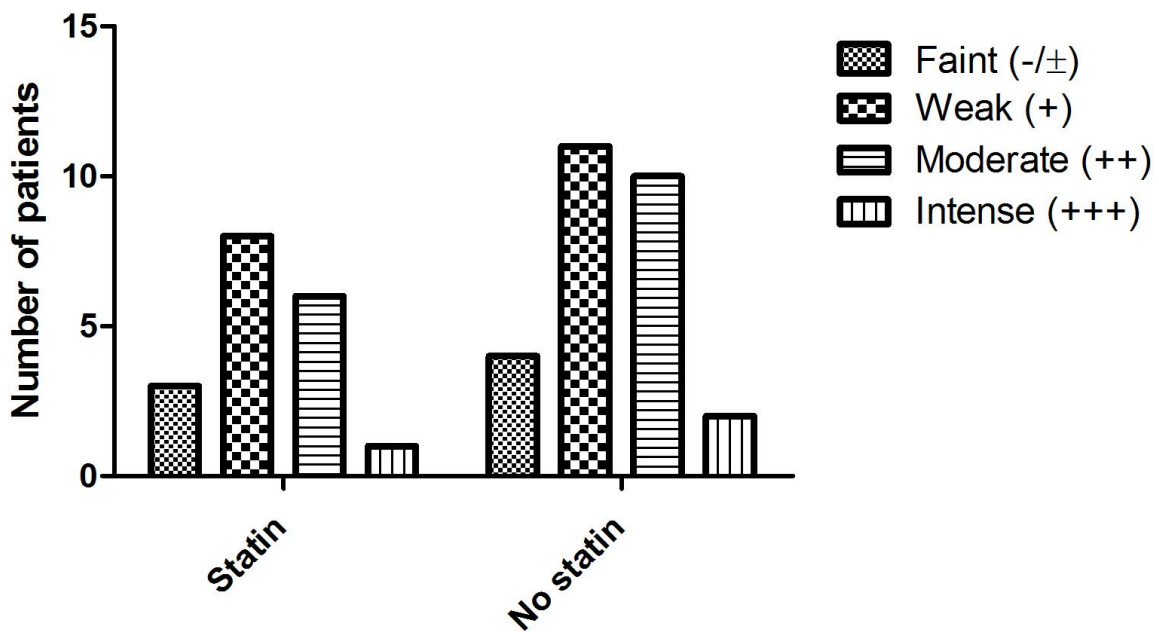
Σχήμα 4.19. Αντιπροσωπευτικές εικόνες έντονης χρώσης [*intense(+++)*] με τη μέθοδο αιματοξυλίνης/ διαμινοβενζιδίνης. A,B: Αφρώδη κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα eNOS (μεγέθυνση: x100, x200). Γ,Δ,Ε: Ανοσοχρώση στα αφρώδη κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας η οποία καταλαμβάνει μεγάλο μέρος του εσω και μέσω χιτώνα, καθώς και στα λεία μυϊκά κύτταρα γύρω από την πλάκα (15) (μεγέθυνση: x25 x100, x100).







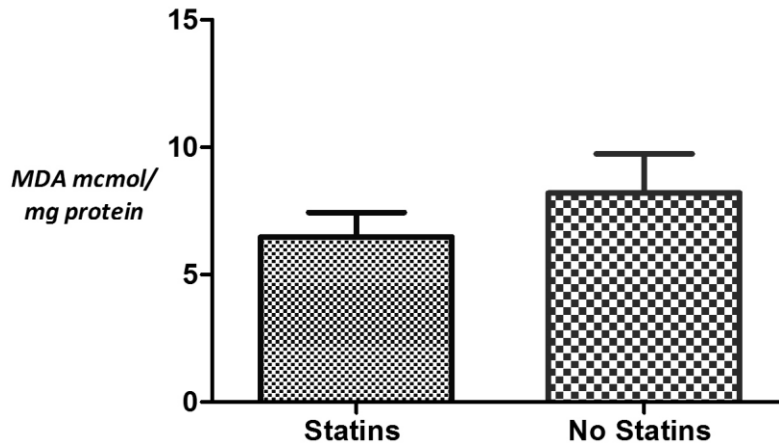
Σχήμα 4.20. Ιστόγραμμα που απεικονίζει πως κατανέμονται οι ιστοί ανάλογα με την έκφραση της eNOS και τη σταθερότητα της πλάκας.



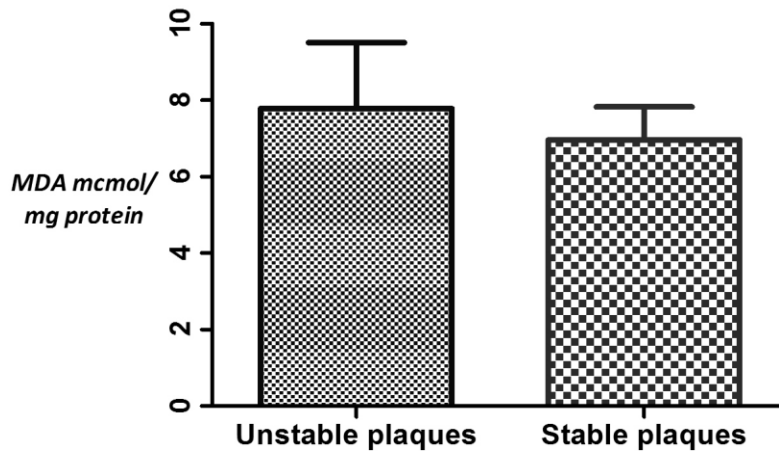
Σχήμα 4.21. Ιστόγραμμα που απεικονίζει πως κατανέμονται οι ιστοί ανάλογα με την έκφραση της eNOS και τη λήψη ή όχι στατινών.

Μέτρηση μηλονικής διαλδεΐδης

Τα αποτελέσματα από την εργαστηριακή μέτρηση της MDA παρατίθενται παρακάτω.



Σχήμα 4.22. Επίπεδα MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$) σε ασθενείς που λάμβαναν στατίνη και σε ασθενείς που δεν λάμβαναν στατίνη



Σχήμα 4.23. Επίπεδα MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$) σε ασθενείς με ασταθή αθηρωματική πλάκα και σε ασθενείς με σταθερή αθηρωματική πλάκα

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αθηροσκλήρωση είναι το αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής η οποία εξελίσσεται και διαιωνίζεται λόγω δυσλειτουργικού ενδοθηλίου. Το οξειδωτικό στρες συμβάλλει και αυτό στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών, ωστόσο δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως οι μηχανισμοί των παραπάνω διαδικασιών. Επιπλέον, μελέτες υποδεικνύουν ότι οι στατίνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε παγκόσμια κλίμακα για να μειώσουν το ρίσκο του καρδιαγγειακού κινδύνου, έχουν πλειοτροπικές δράσεις πέραν του μηχανισμού μείωσης των επιπέδων των λιπιδίων.

Με την προηγούμενη μελέτη της επιστημονικής μας ομάδας συσχέτισαμε τα αυξημένα επίπεδα της οξειδωμένης LDL και του υπεροξυνιτρόδους ανιόντος με ασταθείς αθηρωματικές πλάκες και προχωρημένα στάδια της αθηροσκληρωτικής νόσου.⁸⁷ Η ολοένα αυξανόμενη χρήση των στατινών, η πληθώρα των κλινικών μελετών και η διαρκής αναζήτηση θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων, μας ώθησε να συμπεριλάβουμε στη μελέτη μας τη χρήση των στατινών. Η έρευνα αυτή παρέχει καινούριες πληροφορίες σχετικά με τη συμβολή και το μηχανισμό δράσης των στατινών στη σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών.

Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τις στατίνες με την αρνητική διαμόρφωση των αγγείων (negative remodeling). Η μελέτη TRUTH⁹⁵ έδειξε ότι οι στεφανιαίες αρτηρίες είχαν αρνητική αναδιαμόρφωση δηλαδή μείωση της πλάκας (regression) κατά τη διάρκεια θεραπείας με στατίνες. Επίσης σε σύγκριση με πλάκες οι οποίες είχαν ή δεν είχαν εξέλιξη (progression) σημειώθηκε μετατροπή της ινώδους σύστασης. Η μελέτη COSMOS⁹⁶ με τη σειρά της, απέδειξε ότι η περιοχή της πλάκας με θετική αναδιαμόρφωση μειώθηκε σημαντικά μετά από θεραπεία με ροσουβαστατίνη. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και άλλες μεγάλες μελέτες όπως η ASTEROID⁹⁷ και η ESTABLISH⁹⁸.

Η παθολογοανατομική παρατήρηση των δειγμάτων έδωσε μια πρώτη εκτίμηση. Οι ασθενείς οι οποίοι λάμβαναν θεραπευτική αγωγή με στατίνες είχαν πιο σταθερές αθηρωματικές πλάκες από αυτούς που δεν λάμβαναν. Το επόμενο βήμα ήταν να μελετήσουμε σε βάθος το μοριακό μηχανισμό με τον οποίο δρουν.

Οι Oemar et al.⁹⁹ ήταν οι πρώτοι οι οποίοι απέδειξαν ότι η πρωτεϊνική έκφραση της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) και η απελευθέρωση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) είναι μειωμένα σε προχωρημένες αθηρωματικές βλάβες. Το ενδοθηλιακό NO παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του αγγείου, στην προσκόλληση των λευκών αιμοσφαιρίων και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Από τότε έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα και σε ανθρώπους και έχει διαπιστωθεί ότι οι στατίνες αυξάνουν την παραγωγή του NO και βελτιώνουν τη δράση του.

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western Blot διαπιστώνουμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά κατά τον προσδιορισμό της eNOS, σε ασθενείς που έπαιρναν στατίνες σε αντίθεση με αυτούς που δεν έπαιρναν. Οι ασθενείς δηλαδή που έπαιρναν στατίνη είχαν μεγαλύτερη ενεργοποίηση της eNOS. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει ευρήματα προηγούμενων μελετών. Εάν ωστόσο συγκρίνουμε τα αποτελέσματα ως προς τη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Με αφορμή την παρατήρηση αυτή σκεφτήκαμε να προσδιορίσουμε μια άλλη πρωτεΐνη, την Akt, η οποία φωσφορυλιώνει την eNOS στο μονοπάτι PI3k-Akt. Τα αποτελέσματα από την Western Blot ανάλυση δείχνουν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά και στις δυο κατηγορίες των ομάδων (λήψη στατινών, σταθερότητα πλακών).

Ο προσδιορισμός eNOS και Akt σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες με σκοπό τη συσχέτιση των στατινών με τη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών δεν έχει ξαναγίνει και τα ευρήματα είναι ενδιαφέροντα. Οι στατίνες πιθανόν να ενεργοποιούν το μονοπάτι PI3k-Akt και την eNOS, ωστόσο φαίνεται ότι ο μηχανισμός με τον οποίο σταθεροποιούν τις πλάκες μπορεί να διαφέρει. Η Akt πιθανότατα σχετίζεται περισσότερο από την eNOS με τη σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών.

Μελέτες γύρω από το μηχανισμό δράσης των στατινών σε πειραματόζωα έχουν γίνει από διάφορες επιστημονικές ομάδες. Οι Harris et al. μελέτησαν ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής σε βοοειδή και έδειξαν ότι οι στατίνες ενεργοποιούν και φωσφορυλιώνουν την eNOS μέσω της PKA και της Akt.¹⁰⁰ Άλλη μελέτη έδειξε ότι οι στατίνες δρουν άμεσα στην Akt η οποία έπειτα φωσφορυλιώνει την eNOS και παράγει NO.¹⁰¹ Επιπλέον η δική μας ομάδα έδειξε ότι η

πραβαστατίνη ενεργοποιεί την eNOS και την Akt, ανεξαρτήτως του μηχανισμού μείωσης των λιπιδίων.⁸⁸

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη έρευνα γύρω από την Akt και τις δράσεις της. Φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου και ενεργοποιεί άμεσα ή έμμεσα πληθώρα πρωτεϊνών οι οποίες μετέχουν σε ποικίλλες λειτουργίες όπως στον μεταβολισμό γλυκόζης, στην αγγειογένεση, στην απόπτωση, στην πρωτεϊνική σύνθεση και στην κυτταρική ρύθμιση.¹⁰²

Από τα δικά μας ευρήματα θα μπορούσαμε να θέσουμε το εξής ερώτημα: Οι στατίνες μπορούν να επηρεάσουν το μονοπάτι PI3k-Akt και να σταθεροποιήσουν την αθηρωματική πλάκα χωρίς να ενεργοποιήσουν την eNOS; Μήπως η φωσφορυλιωμένη Akt δρα με διαφορετικό μηχανισμό στη συγκεκριμένη περίπτωση, η οποία σχετίζεται κυρίως με φλεγμονώδη μονοπάτια;

Εάν εξετάσουμε τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας, όταν τα δείγματα κατηγοριοποιούνται ως προς τη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών, φαίνεται ότι οι σταθερές πλάκες έχουν μέτρια έκφραση της eNOS και οι ασταθείς πλάκες έχουν ασθενή έκφραση της eNOS. Επίσης το ποσοστό των πλακών με εξασθενημένη έκφραση eNOS είναι μικρότερο στις σταθερές, ενώ το ποσοστό της έντονης έκφρασης της eNOS είναι αρκετά μεγαλύτερο. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα Western Blot όταν προσδιορίστηκε η teNOS/b actin. Γενικά, οι ασταθείς πλάκες είναι περισσότερο εύθραυστες, φλεγμονώδεις, με μεγαλύτερη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, δηλαδή μειωμένη παραγωγή και λειτουργία του μονοξειδίου του αζώτου, από τις σταθερές πλάκες οι οποίες έχουν και καλύτερη πρόγνωση.

Όταν οι πλάκες κατηγοριοποιήθηκαν βάσει της λήψης στατινών, τα αποτελέσματα δεν ήταν παρόμοια. Η λήψη των στατινών δεν φάνηκε να αυξάνει την έκφραση της eNOS στις αθηρωματικές πλάκες. Εδώ επίσης το Western Blot για teNOS/b actin επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναρωτηθούμε αν τελικά είναι επιθυμητή η μη ελεγχόμενη αύξηση της έκφρασης της eNOS. Στο θεωρητικό μέρος επισημάνθηκε ότι η eNOS μπορεί να είναι πηγή ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου, όταν έχουμε το φαινόμενο της αποσύζευξης της eNOS (eNOS

uncoupling) και να επιφέρει αρνητικά, παρά ευεργετικά αποτελέσματα. Επομένως φαίνεται να είναι επιθυμητή μια ισορροπημένη και ελεγχόμενη έκφραση της eNOS, όχι η υπερπαραγωγή της. Με αποτέλεσμα οι στατίνες πιθανόν να μην σταθεροποιούν την πλάκα μέσω της ενεργοποίησης και αύξησης της έκφρασής της αλλά με κάποιον εναλλακτικό μηχανισμό.

Τέλος, σχετικά με τα αποτελέσματα της MDA, σε προηγούμενη μελέτη μας προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε τα επίπεδα της MDA, η οποία θεωρείται σημαντικός δείκτης του οξειδωτικού στρες, με την αποσταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών. Τα αποτελέσματα, μας είχαν δείξει ότι η διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης πιθανώς συμβάλλει στην εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας κυρίως σε πρώιμα στάδια, αλλά δε φαίνεται να αφορά προχωρημένα στάδια που σχετίζονται με την αστάθεια της πλάκας και τη ρήξη αυτής. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαίωσαν τον παραπάνω συλλογισμό. Δεν μπορέσαμε να συσχετίσουμε τα επίπεδα MDA με καμία ομάδα καθώς δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις δυο κατηγορίες που εξετάστηκαν.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας η Akt φαίνεται ότι σχετίζεται περισσότερο με τη σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών σε σχέση με την eNOS. Η σταθεροποίηση των πλακών μπορεί να μην οφείλεται στη φωσφορυλίωση της eNOS και την παραγωγή NO, αλλά στην δράση της Akt μέσω άλλου μονοπατιού. Οι στατίνες σχετίζονται με την ενεργοποίηση της Akt και της eNOS, όπως έχει αποδειχθεί και από προηγούμενες μελέτες αλλά ο μηχανισμός με τον οποίο σταθεροποιούν την αθηρωματική πλάκα θέλει περαιτέρω διερεύνηση.

9. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη μας αφορούσε δείγματα αθηρωματικών πλακών από ασθενείς οι οποίοι είτε λάμβαναν στατίνη είτε δεν λάμβαναν. Πολλές μελέτες έχουν δείξει διαφορές σε κλινικά αποτελέσματα από τη λήψη διαφορετικών ουσιών της ίδιας κατηγορίας.⁶⁸ Για παράδειγμα σε μια μελέτη η σεριβαστατίνη επέφερε βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με την ατορβαστατίνη και την πραβαστατίνη.¹⁰³ Οι διαφορές αυτές προκύπτουν από τις μεταβολές στη διαλυτότητα, στη διαμεμβρανική θέση σύνδεσης στο ένζυμο

και στο μεταβολισμό των στατινών. Επομένως θα ήταν καλό στο μέλλον να μελετηθεί ξεχωριστά η κάθε στατίνη στο ίδιο υπόστρωμα. Επιπλέον η μελέτη θα έπρεπε να λαμβάνει υπόψη τη δόση της στατίνης και τη διάρκεια χορήγησής της καθώς και αυτές οι παράμετροι επηρεάζουν το κλινικό αποτέλεσμα αν και πρακτικά η διαδικασία συλλογής ομοιογενών δειγμάτων είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Davidson S. *Davidson's Παθολογία :Γενικές αρχές και κλινική πράξη της ιατρικής* 19 ed. Αθήνα: Παρισιάνου ΑΕ; 2005.
2. Στεφανίδης ΧΙ. Χρόνια Στεφανιαία Νόσος *ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ*. 2η ed. Αθήνα Πασχαλίδης 2009:183-205.
3. NationMaster. http://www.nationmaster.com/graph/hea_he_a_dis_dea-health-heart-disease-deaths
4. Medical Dictionary <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/atheromatosis>.
5. Καραμπερόπουλος ΔΑ. Ετυμολογική ερμηνεία της αρχαίας ιατρικής ορολογίας (σύμφωνα με αρχαία κείμενα). <http://www.karaberopoulos.gr/karaberopoulos/ergasies/97.asp>, 2012.
6. Kramer DW. Atheromatosis - Atherosclerosis. *ANGIOLOGY*. 1954:46-47.
7. PCNA. http://www.pcna.net/national/documents/Atherosclerosis_Fact_Sheet.4.09.pdf
8. Goodman G. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12 ed: Mc Graw Hill; 2011.
9. Γ Π. *Σύγχρονη Φαρμακολογία και Επιστημονικός οδηγός σκευασμάτων*
10. Harrison. *Εσωτερική Παθολογία (Συνοδό Εγχειρίδιο)*. 16 ed. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου ΑΕ; 2006.
11. Χ. Πίτσαβος ΜΕ, Β. Άθυρος. Κατευθυντήριες οδηγίες για τις δυσλιπιδαιμίες: Διάγνωση και αντιμετώπιση http://www.eof.gr/c/document_library/get_file?p_l_id=14016&folderId=34743&name=DLFE-1127.pdf.
12. Αστέριος Ν. Κατσαμούρης ΑΝΣΧ. Η αιμοδυναμική θεώρηση της αθηρωμάτωσης *Αιμοδυναμική των αγγειακών παθήσεων* Αθήνα: Αθ. Σταμούλης; 2001:77-92.
13. Lawrence W Way GMD. *Σύγχρονη Χειρουργική: Διάγνωση και Θεραπεία*. Vol 2. 12 ed. Αθήνα Εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδη; 2008.
14. Κωστάκης ΑΙ. *Σύγχρονη Χαιρουργική: Διαγνωστική και Θεραπευτική*. Vol 2. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδη; 2005.
15. Roberto Corti JJB. Biological aspects of vulnerable plaque. *Cardiology*. 2002(17):616-625.
16. Endothelium. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Endothelial_cell.jpg, 2012.
17. Chhabra N. Endothelial dysfunction – A predictor of atherosclerosis. *Internet Journal of Medical Update*. January 2009;4(1).
18. AA Q. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med*. July 1998 105(1A):325-395.
19. Mano T MT, Yamamoto K, et al. Endothelial dysfunction in the early stage of atherosclerosis precedes appearance of intimal lesions assessable with intravascular ultrasound. *Am Heart J*. February 1996;131(2):231-238.
20. R R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 340(2):115-126.
21. PM V. Endothelium dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J*. 1997;18:19-29.
22. Luscher TF TF, Noll G. Lipids and endothelial function: effects of lipid-lowering and other therapeutic interventions. *Curr Opin Lipidol*. 1996(7):234-240.
23. Malek AM AS, Izunmo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*. 1999(282):2035-2042.
24. Ku DN GD, Zarins CK, et al. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation: positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis*. 1985(5):293-302.
25. Stary. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995(15):1512-1531.
26. Hamamdizic Wa. The molecular basis of vulnerable plaque: potential therapeutic role for immunomodulation. *Curr Opin Cardiol*. 2007;22(6):545-551.

27. Ambrose JA WS, Stern A, et al. Angiographic morphology and the pathogenesis of unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol*. 1985(5):609-616.
28. Shah PK. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(4):S15-S22.
29. Ambrose A WS, Arora RR, et al. Coronary angiographic morphology in myocardial infarction: a link between the pathogenesis of unstable angina and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1985(6):1233-1238.
30. Falk E SP, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995(92):657-671.
31. Ασταθής, σταθερή πλάκα. http://www.incardiology.gr/pathiseis_lipidia/tel4.gif, 2012.
32. Stable, unstable plaque. <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0033062008000868-gr1.jpg>.
33. Loree HM KR, Stringfellow RG, Lee RT. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ Res*. 1992(71):850-858.
34. MJ D. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. 2000(83):361-366.
35. Schoenhagen P ZK, Kapadia SR, Crowe TD, Nissen SE, Tuzcu EM. Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes: an intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2000(101):598-603.
36. Fernandez-Ortiz A BJ, Falk E, et al. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*. 1994(23):1562-1569.
37. Toschi V GR, Lettino M, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997(95):594-599.
38. Fuster V FZ, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet*. 1999(355):5-9.
39. Y N. Tissue factor and hemostasis. *Blood*. 1988(71):1-8.
40. Rosenberg RD AW. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med*. 1999(340):1555-1564.
41. Rauch U NY. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. *Trends Cardiovasc Med*. 2000(10):139-143.
42. Atheroma. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Endo_dysfunction_Athero.PNG, 2012.
43. Devlin TM. *Βιοχημεία - Κλινικοί Συσχετισμοί*. 1 ed. Αθήνα: Πασχαλίδης; 2007.
44. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology*. 2011(13):43-52.
45. David Harrison KKG, Ulf Landmesser, Burkhard Hornig, Helmut Drexler. Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91:7A-11A.
46. Uma Singh IJ. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*. 2006(13):129-142.
47. ox-LDL. <http://www.medicographia.com/wp-content/uploads/2010/07/107.jpg>.
48. Claudio Napoli FdN, Sharon Williams-Ignarro, Orlando Pignalosa, Vincenzo Sica, Louis J. Ignarro. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Elsevier*. 2006;15:265-279.
49. Yong Liang MFJL, David T. Yew. Immunohistochemical localization of endothelial isoform (eNOS) in human cerebral arteries and the aorta. *Intern. J. Neuroscience*. 2006(116):140-1417.
50. Devlin TM. *Βιοχημεία - Κλινικοί Συσχετισμοί* 1ed. Αθήνα: Πασχαλίδης; 2009.
51. Cell Signaling & Neuroscience Endothelial (eNOS). <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/pathway-slides-and/endothelial-nitric-oxide-synthase-enos.html>.
52. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology* 2004(2):820-832.
53. Pal Pacher JSB, Lucas Liaudet. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *American Physiological Society*. 2007(87):315-424.
54. Homero Rubbo VOD. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology*. 2005(208):305-317.

55. NG Stevens AP, PM Schofield, F Kelly, K Cheeseman, MJ Mitchinson. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996(347):781-786.
56. M Boaz SS, T Weinstein, Z Matas, U Gafter, A Iaina, A Knecht, Y Weissgarten, MS Green. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 2000(356):1213-1218.
57. JC Fang SK, J Beltrame, H Hikiti, M Wainstein, D Behrendt, J Suh, B Frei, P Ganz. Effect of vitamins C and E on pregression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomized trial. *Lancet*. 2002(359):1108-1113.
58. RM Salonen KN, J Kaikkonen, S Voutilainen, TH Rissanen, M Vanharanta, JT Salonen, HE Poulsen. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study. *Circulation* 2003(107):947-953.
59. SK Osganian MS, E Rimm, D Spiegelman, FB Hu, JE Manson, WC Willett. Vitamin C and risk of coronary heart disease in women. *J Am Coll Cardiol*. 2003(42):246-252.
60. The alpha-tocopherol, beta-carotene lung cancer prevention study: design, methods, participant characteristics, and compliance. The ATBC Cancer Prevention Study Group. *Ann Epidemiol*. 1994;4(1):1-10.
61. R. DC. [The Primary Prevention Project Study Group. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomized trial in general practice]. *Ital Heart J Suppl*. 2001;2(6):681-684.
62. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. 1999;354(9177):447-455.
63. Hoogwerf BJ YJ. The HOPE study. Ramipril lowered cardiovascular risk, but vitamin E did not. *Cleve Clin J Med*. 2000;67(4):287-293.
64. Group MBHPSC. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering therapy and of antioxidant vitamin supplementation in a wide range of patients at increased risk of coronary heart disease death: early safety and efficacy experience. *European Heart Journal*. 1999;20:725-741.
65. ΕΟΦ. *Εθνικό Συνταγολόγιο* Αθήνα: ΕΟΦ; 2007.
66. Istvan ES DJ. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001(292):1160-1164.
67. Maron DJ FS, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation*. 2000;101:207-213.
68. Mason PR. Molecular Basis of Differences Among Statins and a Comparison with Antioxidant Vitamins. *Am J Cardiol*. 2006(98):34-41.
69. Mary J Mycek RAH, Pamela C Champe. *Φαρμακολογία* 2ed. Αθήνα: Παρισιάνου ΑΕ; 2000.
70. Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins in endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol* 2003(58):719-731.
71. Fraley AE SG, Olsson AG, Kinlay S, Szarek M, Rifai N, Libby P, Ganz P, Witztum JL, Tsimikas S. Relationship of oxidized phospholipids and biomarkers of oxidized low-density lipoprotein with cardiovascular risk factors, inflammatory biomarkers, and effect of statin therapy in patients with acute coronary syndromes: Results from the MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction With Aggressive Cholesterol Lowering) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(23):2186-2196.
72. Simes RJ MI, Hunt D, Colquhoun D, Sullivan H, Shaw J, Tonkin A. Relationship between lipid levels and clinical outcomes in the Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Trial: to what extent is the reduction in coronary events with pravastatin explained by on-study lipid levels? *Circulation*. 2002;105(10):1162-1169.
73. Bulbulia R BL, Wallendszus K, Parish S, Armitage J, Peto R, Collins R. Effects on 11-year mortality and morbidity of lowering LDL cholesterol with simvastatin for about 5 years in 20,536 high-risk individuals: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;378(9808):2013-2020.

74. Sever PS CC, Prescott MF, Gupta A, Poulter NR, Whitehouse A, Scanlon M. Is plasma renin activity a biomarker for the prediction of renal and cardiovascular outcomes in treated hypertensive patients? Observations from the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Eur Heart J* 2012.
75. Vicente Lahera MG, Soledad Garcia de Vinuesa, Maria Miana, Natalia de las Heras, Victoria Cachofeiro, Jose Luno. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Current Medicinal Chemistry* 2007(14):243-248.
76. Liao JK LU. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* . 2005;45:89-118.
77. Aliaksandr Bulhak JR, Ulf Hedin, Per-Ove Sjoquist, John Pernow. Cardioprotective effect of rosuvastatin in vivo is dependent on inhibition of geranylgeranyl pyrophosphate and altered RhoA membrane translocation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006(292):3158-3163.
78. Pitchai Balakumar SK, Gaurav Taneja, Sanjeev Kalra, Nanjaian Mahadevan. Is targeting eNOS a key mechanistic insight of cardiovascular defensive potentials of statins? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2011(52):83-92.
79. Leever SJ VB, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Current Opinion in Cell Biology.* 1999;11(2):219-225.
80. Song G OG, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005;9(1):59-71.
81. Hausenloy DJ YD. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) pathway. *Cardiovasc Res* 2004(61):448-460.
82. Bell RM YD. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:508-515.
83. Pasceri V PG, Nusca A, Pristipino C, Richichi F, Di Sciascio G. Randomized trial of atorvastatin for reduction of myocardial damage during coronary intervention: results from ARMYDA *Circulation.* 2004;110:674-678.
84. Di Sciascio G PG, Pasceri V, Gaspardone A, Colonna G, Montinaro A. Efficacy of atorvastatin reload in patients on chronic statin therapy undergoing percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA - RECAPTURE. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:558-565.
85. Ji Won Son KKK, Jeong Yeal Ahn, Dong Kyu Jin, Gi Soo Park, Dae Sung Kim, Eak Kyun Shin. Effects of statin on plaque stability and thrombogenicity in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *International Journal of Cardiology.* 2002(88):77-82.
86. Milita Crisby GN-F, Prediman K Shah, Juliana Yano, Jenny Zhu, Jan Nilsson. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases and cell death in human carotid plaques Implications for plaque stabilization. *Circulation.* 2001;103:926-933.
87. Fragiska Sigala AK, Paraskevi Savari, Konstantinos Filis, Sophia Markantonis, Efstathios K Iliodromitis, Vassilis G Gorgoulis, Ioanna Andreadou. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. *J Vasc Surg.* 2010;52:704-713.
88. Ioanna Andreadou DF, Eftihios Prokavas, Fragiska Sigala, Anastasia Zoga, Katerina Spyridaki, Apostolos Papalois, Andreas Papapetropoulos, Maria Anastasiou-Nana, Dimitrios Th. Kremastinos, and Efstathios K. Iliodromitis. Short-term statin administration in hypercholesterolemic rabbits resistant to postconditioning: effects on infarct size, endothelial nitric oxide synthase, and nitro-oxidative stress. *Cardiovasc Res.* 2012;94:501-509.
89. WN B. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". *Analytical Biochemistry.* 112(2):195-203.

90. Renart J RJ, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*.76(7):3116-3120.
91. Towbin H ST, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*.76(9):4350-4354.
92. BIO RAD. Prestained SDS-PAGE Standards. Available at: <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/LSR/PDP/a3482104-9cca-44ba-8752-9bc1d262cc67/Prestained-SDS-PAGE-Standards>. Accessed 2012.
93. Χατζηιωάννου ΘΠ ΚΜ. *Ενόργανη Ανάλυση*. 6 ed. Αθήνα Πανεπιστήμιο Αθηνών 2005.
94. ALDetect™ (MDA-specific) Lipid Peroxidation assay kit. <http://www.enzolifesciences.com/BML-AK171/aldetect-mda-specific-lipid-peroxidation-assay-kit/>, 2012.
95. Nozue T YS, Tohyama S, Umezawa S, Kunishima T, Sato A, Miyake S, Takeyama Y, Morino Y, Yamauchi T, Muramatsu T, Hibi K, Sozu T, Michishita I. Treatment with statin on atheroma regression evaluated by intravascular ultrasound with Virtual Histology (TRUTH Study): rationale and design. *Circulation*. 2009;73(2):352-355.
96. Takayama T HT, Yamagishi M, Daida H, Hirayama A, Saito S, Yamaguchi T, Matsuzaki M. Effect of rosuvastatin on coronary atheroma in stable coronary artery disease: multicenter coronary atherosclerosis study measuring effects of rosuvastatin using intravascular ultrasound in Japanese subjects (COSMOS). *Circulation*. 2009;73(11):2110-2117.
97. Wiviott Stephen D MS, Raichlen Joel S, Cain Valerie A, Nissen Steven E, Libby Peter. Safety and Efficacy of Achieving Very Low Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels With Rosuvastatin 40 mg Daily (from the ASTEROID Study). *The American Journal of Cardiology*. 2009;104(1):29-35.
98. Shinya Okazaki TY, Katsumi Miyauchi, Kazunori Shimada, Takeshi Kurata, Hitoshi Sato, Hiroyuki Daida. Demonstration of the Beneficial Effect on Atherosclerotic Lesions by Serial Volumetric Intravascular Ultrasound Analysis During Half a Year After Coronary Event: The ESTABLISH Study. *Circulation*. 2004;110(9):1021.
99. Oemar Barry TM, Godoy Nelson, Brovkovich Victor, Malinski Tadeusz, Luscher Thomas Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. 1998(97):2494-2498.
100. M. Brennan Harris MAB, Sarika G. Sood, Chunying Li, Jonathan M. Goolsby, Virginia J. Venema, Bruce E. Kemp, Richard C. Venema. Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:560-566.
101. Yasuko Kureishi ZL, Ichiro Shiojima, Ann Bialik, David Fulton, David J. Lefer, William C. Sessa, Kenneth Walsh. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*. 2000;6(9):1004-1010.
102. Fujio Y WK. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem*. . 1999;274(23):16349-16354.
103. Uydes-Dogan BS TGTS, Alp FI, Kaleli D, Ozdemir O. Re;axant effects of pravastatin, atorvastatin and cerivastatin on isolated rat aortic rings. . *Life Sci*. 2005;76:1771-1786.