



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΕΛΕΤΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ**



«Συσχέτιση δεικτών αγγειακής φλεγμονής με την παρουσία και την πρόοδο της υποκλινικής αθηρωμάτωσης σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο»

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΤΟΥ ΙΑΤΡΟΥ
ΑΛΕΞΙΑ Σ. ΜΑΡΕΤΗ**

ΑΘΗΝΑ
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2020

Ημερομηνία αιτήσεως της Διατριβής:

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής: 15/02/2012

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Α. ΚΟΥΡΕΑΣ, Α.Μ. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ,

Α. ΜΗΤΡΑΚΟΥ

Αντικατάσταση επιβλέποντος: Κ. ΣΤΑΜΑΤΕΛΟΠΟΥΛΟΣ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27/04/2012

Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής: 17/12/2020

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής : ΚΑΘ. ΠΕΤΡΟΣ Π. ΣΦΗΚΑΚΗΣ

Μέλη επταμελούς επιτροπής:

1. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ ΜΕΛΕΤΙΟΣ - ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

2. ΜΗΤΡΑΚΟΥ ΦΑΝΑΡΙΩΤΟΥ ΑΣΗΜΙΝΑ

3. ΒΛΑΧΟΠΟΥΛΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

4. ΣΤΑΜΑΤΕΛΟΠΟΥΛΟΣ ΚΙΜΩΝ

5. ΠΡΩΤΟΓΕΡΟΥ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

6. ΜΑΝΙΟΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ

7. ΓΑΒΡΙΑΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διατριβή : Άριστα



Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ
ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΤΕ ΜΕΤΡΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΣΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΟΥΤΩΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΣΙΖΟΥΣΙ ΜΑΘΗΤΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΗΣΙΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑ
ΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΡ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΑΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ
ΔΙΔΙΤΗ ΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΨΕΙΝ ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΜΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ ΟΥ ΤΕ ΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΛΜΤΑΣ ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΨΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ, Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Α ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΨΙΔΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Μάρτιος 2020	Απόκτηση του τίτλου ειδικότητας της καρδιολογίας
Σεπτέμβριος 2010	Ιατρική Σχολή Πανεπιστήμιο "ΟVIDIUS" ΚΩΝΣΤΑΝΤΣΑ Πτυχίο Ιατρικής - Βαθμός:8.6/10
Ιούνιος 2004	3 ^ο Λύκειο Άρτας - Απολυτήριο

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Οκτώβριος 2019 έως σήμερα	Σε παράταση σε θέση ειδικευόμενου καρδιολογίας στο Καρδιολογικό Τομέα της Θεραπευτικής Κλινικής του Γ.Ν.Α Αλεξάνδρα.
Οκτώβριος 2015 - Οκτώβριος 2019	Ειδικευόμενη Καρδιολογίας - Εκπλήρωση της 4ετούς εκπαίδευσης Καρδιολογίας στο Καρδιολογικό Τομέα της Θεραπευτικής Κλινικής του Γ.Ν.Α Αλεξάνδρα Καρδιολογικός Τομέας. Παρακολούθηση ασθενών με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια σταδίου II-IV κατά ΝΥΗΑ στο ιατρείο Καρδιακής Ανεπάρκειας.
Οκτώβριος 2013 - Μάϊος 2015	Ειδικευόμενη Παθολογίας στην Θεραπευτική Κλινικής του Γ.Ν.Α Αλεξάνδρα Παθολογικός Τομέας - Εκπλήρωση της απαραίτητης 2ετούς εκπαίδευσης Παθολογίας για την έναρξη της ειδικότητας της Καρδιολογίας.
Αύγουστος 2012- Αύγουστος 2013	Αγροτικός Ιατρός στο Άγιο Π.Ι Βελεντζικού του Κ.Υ Άνω Καλεντίνης, του ΓΝ Άρτας

ΒΡΑΒΕΙΑ

1. **39^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο της Ελληνικής Καρδιολογικής εταιρείας, Αθήνα 2018.** 3^ο βραβείο καλύτερης εργασίας νέων καρδιολόγων για την εργασία με τίτλο "Η αυξημένη ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή σχετίζεται με τη θνητότητα σε ασθενείς με συστηματική πρωτοπαθή αμυλοείδωση ελαφρών αλύσων (AL)". **Α.Μαρέτη, Κ. Σταματελόπουλος, Γ. Γεωργιόπουλος, Φ.Αθανασούλη, Μ.Λύκα, Α.Λαϊνά, Μ. Ρούσσου, Μ. Γαβριατοπούλου, Κ.Παμπούκας, Ι.Κανακάκης, Ε.Μανιός, Χ.Παπαμιχαήλ, Κ.Στέλλος, Ε.Τέρπος, Μ.Α.Δημόπουλος, Ε.Καστρίτης**
2. **39^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο της Ελληνικής Καρδιολογικής εταιρείας, Αθήνα 2018.** Έπαινος ερευνητικής εργασίας για την εργασία με τίτλο: "Η επίδραση της μείωσης της καρδιακής συχνότητας με πρόιμη χορήγηση β αναστολέα μετά την πρωτογενή αγγειοπλαστική στην έκταση του εμφράγματος και την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με οξύ διατοιχωματικό έμφραγμα μυοκαρδίου. Προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη." **Α.Νταλιανής, Μ.Κονδύλης, Ε.Ρεπάσος, Α.Κουτσούκης, Α.Μαρέτη, Χ.Παπαγεωργίου, Κ.Ταμπάκης, Γ.Μακαβός, Ε.Αννινός, Σ.Μαυρογένη, Ι.Κανακάκης, Ι. Παρασκευαΐδης.**
3. **19^ο Πανελλήνιο συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2018.** 4^ο βραβείο προφορικής ανακοίνωσης για την εργασία με τίτλο : "Προγνωστική αξία του υπερηχοκαρδιογραφικού φαινοτύπου σε ασθενείς με καρδιακή αμυλοείδωση." **Α.Νταλιάνης, Ε.Τσέλιου, Ε.Ρεπάσος, Η.Παπαδοπούλου, Κ.Παμπούκας, Δ.Ζιώγας, Ε.Καστρίτης, Α.Κουτσούκης, Α.Μαρέτη, Ι. Σταμουλόπουλος, Α.Κοέν, Σ. Τουμανίδης, Μ.Α.Δημόπουλος, Ι.Παρασκευαΐδης.**

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- **Alexia Mareti**, Chrysoula Kritsioti, Georgios Georgiopoulos, Nikolaos I Vlachogiannis, Dimitris Delialis, Marco Sachse, Kateryna Sopova, Athanasios Koutsoukis, Christos Kontogiannis, Raphael Patras, Simon Tual-Chalot, Andreas Koureas, Aikaterini Gatsiou, Konstantinos Stellos and Kimon Stamatelopoulos Cathepsin B expression is associated with arterial stiffening and atherosclerotic vascular disease. Eur J Prev Cardiol. 2019
- G. Georgiopoulos ,K. Karatzi ,E. Euthimiou, A. Laina , C. Kontogiannis , **A. Mareti** , I. Mavroeidis, A. Kouzoupis, A. Mitrakou, C. Papamichael, Kimon Stamatelopoulos Association of macronutrient consumption with arterial aging in adults without clinically overt cardiovascular disease: a 5-year prospective cohort study. Eur J Nutr. 2019
- Georgios Georgiopoulos, Theodore G. Papaioannou, Nikos Magka, Ageliki Laina, **Alexia Mareti** , Stelios Georgiou, Ioannis Mavroeidis, Elisa Samouilidou, Dimitris Delialis, Dimitris Tousoulis, John Kanakakis and Kimon Stamatelopoulos. Age-dependent association of pulse wave velocity with coronary artery disease and myocardial aging in high-risk patients. J Cardiovasc Med (Hagerstown). 2019
- G. Georgiopoulos, K. Karatzi, M. Yannakoulia, E. Georgousopoulou, E. Efthimiou, **A. Mareti**, I. Bakogianni, A. Mitrakou, C. Papamichael and K. Stamatelopoulos. Eating frequency predicts changes in regional body fat distribution in healthy adults. QJM 2017

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- A Ntalianis, IP Petropoulous, I Stamoulopoulos, E Repasos, G Maglaras, A Mareti, M Kondylis, N Zografos, A Koen, K Tampakis, A Misegiannidis, E Venieri, N Makris, I Kanakakis, I Paraskevaidis, Small tolerated enalapril doses before ARNI administration predicts adverse events during ARNI up-titration . 6th World Congress on Acute Heart Failure (ESC), Athens 2019
- A Ntalianis, A Misegiannidis, K Tampakis, E Repasos, M Kondylis, I Petropoulos, G Maglaras, E Aninos, A Mareti, E Venieri, N Zografos, F Zagouri, N Pampoukas, MA Dimopoulo, I Paraskevaidis. First preliminary demographic data of the referrals from a university hospital Cardio-Oncology outpatient clinic . 6th World Congress on Acute Heart Failure (ESC), Athens 2019
- Gergiopoulos, G.; Mavroeidis, I.; Sopova, K.; Sacshe, M.; Delialis, D.; Mareti, A.; Kritsioti, C.; Vlachogiannis, N.; Laina, A.; Mantzou, E.; Martelli, F.; Spyridopoulos, I.; Gatsiou, A.; Manios, E.; Stellos, K.; Stamatelopoulos, K..AMYLOID BETA 1-40 AND ITS UPSTREAM REGULATORY PATHWAY BACE1-AS LONG NONCODING RNA/BACE1 ARE ASSOCIATED WITH PRESENCE AND SEVERITY OF HUMAN ATHEROSCLEROTIC DISEASE. Journal of Hypertension: July 2019
- M Sachse, A Mareti, G Georgiopoulos, K Sopova, N Vlachogiannis, S Tual-Chalot, C Kritsioti, A Laina, C Kontogiannis, A Zaman, I Spyridopoulos, A Gatsiou, K Stamatelopoulos, K Stellos. Peripheral blood mononuclear cell expression of the stabilizing RNA-binding protein HuR is associated with incidence and extent of human atherosclerotic cardiovascular disease. European Heart Journal. 2019
- G Georgiopoulos, A Laina, A Alexopoulou, A Mareti, D Bampatsias, L Karapanou, S Pouriki, I Kanakakis, L Vasilieva, I Mani, E Koutli, I Mavroeidis, C Papamichael, S P Dourakis, K Stamatelopoulos. Deterioration of vascular and hemodynamic markers

during and after pegylated interferon and ribavirin treatment for chronic hepatitis C. European Heart Journal, 2018

- G. Georgiopoulos, C. Kontogiannis, A. Laina, D. Stakos, A. Mareti, I. Bakogianni, I. Petropoulos, I. Kanakakis, A. Augoulea, E. Armeni, S. Chatzidou, L. Karapanou, D. Mrampatsias, I. Labrinoudaki, K. Stamatelopoulos. Abdominal tissue echogenicity in postmenopausal women. A novel marker of morbid obesity? . European Society of Cardiology (ESC) congress, Munich 2018

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθηνά 2018** . "Προγνωστική αξία του υπερηχοκαρδιογραφικού φαινοτύπου σε ασθενείς με καρδιακή αμυλοείδωση" Α. Νταλιάνης, Ε. Τσέλιου, Ε. Ρεπάσος, Η. Παπαδοπούλου, Κ. Παμπούκας, Δ. Ζιώγας, Ε. Καστρίτης, Α. Κουτσούκης, **Α. Μαρέτη**, Ι. Σταμουλόπουλος, Α. Κοέν, Σ. Τουμανίδης, Μ.Α. Δημόπουλος, Ι. Παρασκευαΐδης
- **Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθηνά 2018** . "Συσχέτιση της αορτικής σκληρίας με το κλάσμα εξώθησης και την έκταση του εμφράγματος σε ασθενείς με πρόσθιο έμφραγμα του μυοκαρδίου ως πρώτη εκδήλωση στεφανιαίας νόσου". Ε. Άννινος, **Α. Μαρέτη**, Κ. Ταμπάκης, Ι. Παρασκευαΐδης

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΣΕ ΒΙΒΛΙΑ

- **Μαρέτη Α**, Μπαρμπούτης Ι, Τσαγάλου Ε. Θεραπευτικές εξελίξεις 2019, τεσσαρακοστός τέταρτος τόμος. "Οξεία αναπνευστική δυσχέρεια ενηλίκων", "Πνευμονική εμβολή", "Πνευμονική υπέρταση", Καρδιοαναπνευστική ανακοπή" Εκδόσεις ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, σελίδες 55-69, 2019

ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ

- **Ομάδες εργασίας Ηχοκαρδιολογίας της Ελληνικής Καρδιολογικής Εταιρείας 2018-2019** Α.Μαρέτη "Παθήσεις Θωρακικής Αορτής".
- **4^ο Διεθνές Συνέδριο Καρδιαγγειακής Απεικόνισης στην Κλινική Πράξη, Αθήνα 2019**, Ομάδα εργασίας υπερηχοκαρδιογραφίας - Κλινικά σενάρια.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- **Αγγλική**: Άριστα (ECPE University of Michigan)
- **Γερμανική**: Λίαν Καλώς (B1)
- **Ιταλική**: Superiore

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος -Ευχαριστίες

Περίληψη

Abstract

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή	1
2. Αθηρωματική νόσος	2
2.1 Ταξινόμηση αθηροσκληρυντικών βλαβών	2
2.2. Παθοφυσιολογία αθηροσκλήρυνσης	7
2.3 Μηχανισμοί αθηροσκλήρυνσης	10
2.4 Επιπλοκές αθηροσκλήρυνσης	16
3. Αγγειακή γήρανση	21
3.1 Αρτηριακή σκληρία	22
3.2 Αγγειακή γήρανση και αρτηριακή σκληρία - Μηχανισμοί	23
3.3 Εκτίμηση αρτηριακής σκληρίας	27
4. Καθεψίνες	33
4.1 Γενικά	33
4.2 Εντοπισμός και ιδιότητες	34
4.3 Κυστεϊνοπρωτεάσες	36
4.4 Κυστεϊνοπρωτεάσες και αθηροσκλήρυνση	38
4.5 Ομάδες κυστεϊνοπρωτεασών	39
4.6 Καθεψίνη B και αθηροσκλήρυνση	47
4.7 Καθεψίνη S και αθηροσκλήρυνση	48
4.8 Καθεψίνη S, καθεψίνη B και αρτηριακή σκληρία	50
4.9 Καθεψίνη S και καθεψίνη B ως προγνωστικοί δείκτες καρδιαγγειακών συμβαμάτων	51

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Πρωτόκολλο	54
5.1 Υπόθεση	54
5.2 Σκοπός του πρωτοκόλλου	59
5.3 Σχεδιασμός και μέθοδοι	59
5.3.1 Πληθυσμός	59
5.3.2 Βιοχημικές μετρήσεις	62
5.3.3 Απομόνωση μονοπύρηνων από το περιφερικό αίμα (PBMCs)	62
5.3.4 Έκφραση mRNA της καθεψίνης B και της καθεψίνης S	65
5.3.5 Αγγειολογικές εξετάσεις	66
5.3.6 Στεφανιογραφικός έλεγχος	69
5.3.7 Ορισμός αγγειακών πεδίων	70
5.3.8 Υπερηχοκαρδιογραφικός έλεγχος	70
5.3.9 Παρακολούθηση ασθενών	70
5.4 Στατιστική επεξεργασία	71
6. ΑΠΟΛΕΣΜΑΤΑ	
6.1 Περιγραφικά Στατιστικά Αποτελέσματα	74
6.2 Μονοπαραγοντικές συσχετίσεις	88
6.3 Πολυπαραγοντικές συσχετίσεις	111
6.4 Πρόοδος αθηρωμάτωσης και καθεψίνες	118
6.5 Καρδιαγγειακά συμβάματα και καθεψίνη B	124
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
7.1 Γενικά	128
7.2 Περιορισμοί	138
7.3 Συμπεράσματα	139
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	141

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με αφορμή την παρουσίαση της διδακτορικής μου διατριβής με θέμα «*Συσχέτιση δεικτών αγγειακής φλεγμονής με την παρουσία και την πρόοδο της υποκλινικής αθηρωμάτωσης σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο*» θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους Καθηγητές μου, στους συνεργάτες μου και στην θεραπευτική κλινική του Γ.Ν.Α. Αλεξάνδρα.

Ειδικότερα:

Στον αναπλ. Καθηγητή *Κίμωνα Σταματελόπουλο*, ο οποίος ήταν αυτός που με ενέπνευσε να ασχοληθώ με την έρευνα, που μου δίδαξε την αφοσίωση και την συνέπεια σε αυτό που κάνω, αλλά και εκείνος που μου παρείχε κατά την συγγραφή ουσιαστική συνδρομή προσφέροντάς μου, σε καθημερινό σχεδόν επίπεδο, την υπερπολύτιμη γνώμη του και διαρκή ενθάρρυνση.

Στον Διευθυντή του Αγγειολογικού Εργαστηρίου *Χρήστο Παπαμιχαήλ* για την εκπαίδευση μου στους υπερήχους των αγγείων και την ευγενική παραχώρηση υλικοτεχνικού εξοπλισμού για τις ανάγκες της διατριβής.

Στον Καθηγητή *Α. Μελέτιο Δημόπουλο* και την Καθηγήτρια *Ασημίνα Μητράκου* για τις συμβουλές τους και την ηθική τους συμπαράσταση .

Σε όλη την ομάδα του Αγγειολογικού Εργαστηρίου για την συνεργασία τους και ιδιαίτερα στον *Γεώργιο Γεωργιόπουλο* και στην *Φανή Αθανασούλη* για την καθοριστική συμβολή στην αξιολόγηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων, καθώς και στους υποψήφιους διδάκτορες *Νικόλαο Μακρή* και *Αγγελική Λαϊνά*, στον *συνάδελφο μου Αθανάσιο Κουτσούκη* και στην τεχνολόγο *Μαρίνα Καρακίτσου*, καθώς χωρίς την συνεργασία αυτής της ομάδας δεν θα ήταν δυνατή η πραγμάτωση της διατριβής.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα, και από την θέση αυτή, να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στους δύο ανθρώπους στους οποίους αφιερώνω την παρούσα μελέτη: Στον πατέρα μου, Σωτήριο Μαρέτη και στην μητέρα μου Κυριακή Πουλατσόγλου-Μαρέτη που χρωστώ τα πάντα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν τον κεντρικό ρόλο της καθεψίνης Β (CTSB) και της καθεψίνης S (CTSS) στην γήρανση, στην αθηρογένεση και στην ρήξη των αθηρωματικών πλακών, όμως η κλινική σημασία αυτών των πρωτεασών στα πρώιμα στάδια της αθηροσκληρυντικής καρδιακής νόσου και της αγγειακής γήρανσης παραμένει άγνωστη. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να αξιολογηθεί η σχέση της έκφρασης της καθεψίνης Β και της καθεψίνης S με την αγγειακή γήρανση και την αθηροσκλήρυνση στους ανθρώπους.

Μέθοδοι

Συμπεριελήφθησαν 249 άτομα, από τα οποία οι 162 δεν είχαν κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο, οι 51 είχαν σταθερή στεφανιαία νόσο (ΣΝ) και οι 36 οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (ΟΕΜ). Σε αυτό τον πληθυσμό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της έκφρασης της CTSB και της CTSS στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs), καθώς και αιμοδυναμικές και αγγειολογικές μετρήσεις οι οποίες συμπεριλάμβαναν τη μέτρηση ταχύτητας σφυγμικού κύματος (PWV) ως δείκτη αρτηριακής σκληρίας και αγγειακής γήρανσης και το υπερηχογράφημα καρωτίδων και μηριαίων αρτηριών, το οποίο επιτρέπει την εκτίμηση της παρουσίας και έκτασης της υποκλινικής περιφερικής αθηρωματικής νόσου. Τυχαίο δείγμα του πληθυσμού (n=100) επανεξετάστηκε σε δεύτερη επίσκεψη, 3 έτη μετά την πρώτη εκτίμηση. Οι ασθενείς παρακολούθηθηκαν για καρδιαγγειακά συμβάματα και ως σύμπλοκο τελικό σημείο ορίστηκε ο θάνατος από όλες τις αιτίες, το ΟΕΜ και η ανάγκη επαναγγείωσης σε στεφανιαία αρτηρία.

Αποτελέσματα

Ο πληθυσμός χωρίς κλινικά έκδηλη ΣΝ στο ανώτερο τριτημόριο έκφρασης της CTSB παρουσίασε 4 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να έχει υψηλή PWV (OR=4.38, 95% CI 1.20-15.9, p=0.025) μετά από στάθμιση για τους κλασσικούς παράγοντες κινδύνου και την νεφρική λειτουργία. Αντίστοιχη σχέση παρατηρήθηκε και με την CTSS αλλά η στατιστική σημαντικότητα εξασθένησε μετά την πολυπαραγοντική

ανάλυση ($p=0.084$). Η έκφραση της CTSB ($p=0.006$) και της CTSS ($p<0.001$) ήταν αυξημένη στον πληθυσμό με ΣΝ σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ, ενώ σημαντική αύξηση της CTSS παρατηρήθηκε στην σταθερή ΣΝ έναντι του πληθυσμού χωρίς ΣΝ ($p=0.036$). Τα επίπεδα της CTSB ($p=0.048$) και της CTSS ($p=0.026$) συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών, μετά από στάθμιση για τους κλασσικούς παράγοντες κινδύνου και τη νεφρική λειτουργία. Στον συνολικό πληθυσμό η αυξημένη έκφραση της CTSB, αλλά όχι της CTSS, συσχετίστηκε με τον αριθμό των νοσούντων αρτηριακών δικτύων (παρουσία υποκλινικής ή κλινικά έκδηλης βλάβης στις καρωτίδες, στις μηριαίες αρτηρίες, την αορτή και τα στεφανιαία αγγεία, $OR=1.60$, $95\%CI$ 1.05-2.43, στο ανώτερο έναντι κατωτέρων τριτημορίων, $p=0.029$), μετά από στάθμιση για τους κλασσικούς παράγοντες κινδύνου, τη νεφρική λειτουργία και τη παρουσία στεφανιαίας νόσου. Σε υποπληθυσμό συμμετεχόντων που επανεξετάστηκαν σε διάμεσο χρονικό διάστημα 3 ετών, η αυξημένη CTSS, αλλά όχι η CTSB, κατά την πρώτη επίσκεψη συσχετίστηκε με μεγαλύτερη αύξηση της αρτηριακής σκληρίας κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης ($p<0.05$ για την αλληλεπίδραση μεταξύ των ομάδων τριτημορίων CTSS). Τέλος, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της CTSB (3^ο τριτημόριο) συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του σύμπλοκου τελικού σημείου συμβαμάτων ($adjusted$ HR 3.88, $95\%CI$ 1.43-10.53, $p=0.008$).

Συμπεράσματα

Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης CTSB και CTSS στα PBMCs σχετίζονται με μεγαλύτερη αρτηριακή σκληρία, υποκλινική και κλινική αθηρωμάτωση. Επιπλέον η αυξημένη έκφραση CTSS συσχετίστηκε με ταχύτερο ρυθμό προόδου της αρτηριακής σκληρίας. Αυτά τα ευρήματα ενισχύουν μηχανιστικά τον ρόλο των καθεψινών στην επιταχυνόμενη αγγειακή γήρανση και την αθηροσκλήρυνση και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης για την αξιολόγησή τους ως πιθανοί βιοδείκτες στην καρδιαγγειακή νόσο.

SUMMARY

Background

The central role of of cathepsin B (CTSB) and cathepsin S (CTSS) in ageing processes, atherogenesis and atherosclerotic plaque rupture, is supported by experimental evidence, but the clinical significance of its involvement in early stages of atherosclerotic heart disease and in vascular aging is still unknown. We aimed to assess the association of CTSB and CTSS expression levels with vascular aging and atherosclerosis in humans.

Methods

CTSB and CTSS expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was measured in 249 consecutive subjects [162 without clinically overt coronary artery disease (CAD), 51 with stable CAD and 36 with acute myocardial infarction (AMI)]. Participants underwent peripheral vascular assessment by measurement of aortic hemodynamics, pulse wave velocity (PWV) as marker of arterials stiffness and vascular aging and by carotid and femoral ultrasound appreciating the presence and extension of subclinical peripheral arterial disease. A random sample of the population (n=100) was reevaluated 3 years after first examination. Patients were monitored for cardiovascular events, and as the final outcome was determined death of all causes, AMI and revascularization of coronary artery.

Results

Non-CAD subjects in the highest tertile of CTSB presented 4-fold increased odds for higher PWV (OR=4.38, 1.20-15.9, p=0.025) after risk adjustment for traditional CAD factors and renal function. CTSS presented similar association but statistical significance was lost after multifactorial adjustment.(p=0.084). CTSB (p=0.006) and CTSS (p<0.001) expression was increased in patients with CAD compared to population without clinically overt CAD. CTSS expression was also increased in stable CAD group compared to controls (p=0.036). CTSB (p=0.048) and CTSS (p=0.026) increased levels were independently associated with the number of diseased

coronary arteries after adjustment for risk factors and renal function. In the total cohort, increased CTSB expression, but not CTSS expression, was associated with the number of diseased arterial beds (subclinical or clinical presence of lesion in carotid and femoral arteries, in aorta and in coronary arteries, adjusted OR=1.60, 1.05-2.43, for highest versus lower tertiles, $p=0.029$) after adjustment for risk factors, renal function and presence of CAD. In a subgroup of population that was examined after 3 years, increased CTSS expression, but not CTSB, during first visit, was associated with increased progression of arterial stiffness during follow up ($p<0.05$ for group interaction of CTSS). Finally, increased CTSB expression (3rd tertile) was associated with increased risk of future cardiovascular events (adjusted HR 3.88, 95%CI 1.43-10.53, $p=0.008$).

Conclusion

Increased CTSB and CTSS expression is associated with aortic stiffness, subclinical and clinical atherosclerotic disease. Moreover increased CTSS expression was associated with accelerated arterial stiffening. These findings suggest a mechanistic role of CTSB and CTSS in accelerating vascular aging and atherosclerosis and future studies should elucidate the potential role of cathepsins as biomarkers in cardiovascular disease.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Η καρδιαγγειακή νόσος η οποία περιλαμβάνει την στεφανιαία νόσο , την υπέρταση και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως, με την αθηροσκληρυντική στεφανιαία νόσο και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο να αποτελούν τις δύο κύριες αιτίες . Το 2015 αναφέρθηκαν πάνω από 17 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως από καρδιαγγειακή αιτία, αντιπροσωπεύοντας το 31% όλων των θανάτων. Από αυτούς τους θανάτους, τα 7.4 εκατομμύρια οφειλόταν σε στεφανιαία νόσο και τα 6.7 εκατομμύρια σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (1). Παρόλο που η στεφανιαία νόσος παραμένει η κυρίαρχη αιτία θανάτου στον ενήλικο πληθυσμό παγκοσμίως, οι εξελίξεις των τελευταίων δεκαετιών όσον αφορά την πρόληψη, την τροποποίηση των κλασσικών παραγόντων κινδύνου, καθώς και την θεραπεία των καρδιαγγειακών συμβαμάτων έχουν μειώσει τους θανάτους σε γυναίκες και σε άντρες.

Η αθηροσκλήρυνση, μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αρτηριών, είναι η πιο συχνή παθοφυσιολογική αιτία των καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Η αθηροσκλήρυνση είναι μια εξελισσόμενη νόσος που ξεκινάει συνήθως νωρίς , σε υποκλινική μορφή και παραμένει ασυμπτωματική έως ότου εκδηλωθεί κάποιο οξύ επεισόδιο όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου ή αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Η υποκλινική αθηροσκλήρυνση είναι ένας πρώιμος δείκτης αθηρωματικού φορτίου και η έγκαιρη αναγνώριση μπορεί να επιβραδύνει ή και να προλάβει την εξέλιξη της νόσου και ένα πιθανό καρδιαγγειακό συμβάν (2).

Δεδομένου ότι η αθηρωμάτωση αποτελεί μια διάχυτη νόσος που μπορεί να διαδράμει ασυμπτωματική για δεκαετίες και σχετίζεται με εκδήλωση εστιακών συμβαμάτων αυξημένης νοσηρότητας και θνησιμότητας, η συνεχιζόμενη εντατική έρευνα για την αποκρυπτογράφηση της παθογένειας και για τη δυνατότητα πρόωμης διάγνωσης καθίσταται αναγκαία και ταυτόχρονα ερμηνεύει και νοηματοδοτεί και την παρούσα διατριβή.

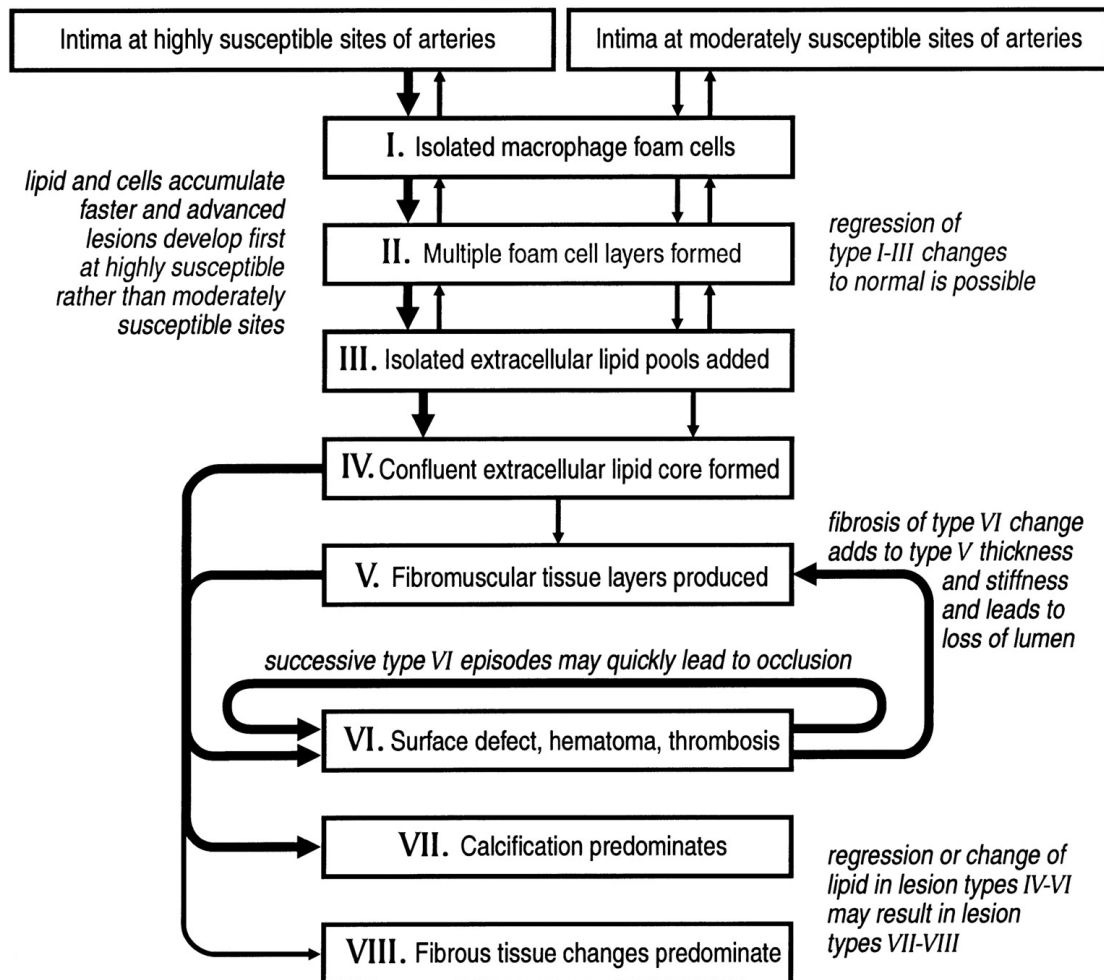
2. Αθηρωματική νόσος

Η αθηρωμάτωση αποτελεί μια νοσολογική οντότητα πολυπαραγοντικής αιτιολογίας που προσβάλλει κυρίως τον έσω χιτώνα μεγάλων και μεσαίων αρτηριών της συστηματικής κυκλοφορίας. Συνιστά μια ενεργή διαδικασία που περιλαμβάνει τα στοιχεία χρόνιας φλεγμονής συνδεδεμένα με μηχανισμούς επιδιόρθωσης του αρτηριακού τοιχώματος και χαρακτηρίζεται από συσσώρευση χοληστερόλης, διήθηση από μακροφάγα, πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών ινών, συσσώρευση συνδετικού ιστού και σχηματισμό θρόμβου. Παρόλο την πολυπαραγοντική αιτιολογία της νόσου και των πολλαπλών συστημικών παραγόντων που συμμετέχουν στην ανάπτυξή της, η αθηροσκλήρυνση επηρεάζει συγκεκριμένες περιοχές του αγγειακού συστήματος. Η αθηροσκλήρυνση μπορεί να εμφανιστεί στα πολύ πρώιμα στάδια της ζωής καθώς έχουν παρατηρηθεί λιπώδεις γραμμώσεις στην αορτή νεογνών από μητέρες με υπερχοληστερολαιμία (3), ενώ στην δεύτερη δεκαετία συνήθως η νόσος εμφανίζεται στις στεφανιαίες αρτηρίες και στην τρίτη δεκαετία της ζωής στις εγκεφαλικές αρτηρίες. Επιπλέον η αθηροσκλήρυνση παρουσιάζει ετερογένεια σε βάθος χρόνου καθώς είναι μια νόσος τόσο με χρόνιες όσο και με οξείες εκδηλώσεις και μπορεί να εκδηλωθεί είτε με στένωση του αυλού των αρτηριών είτε με διάταση - ανεύρυσμα.

2.1 Ταξινόμηση αθηροσκληρυντικών βλαβών.

Ο Αμερικανικός Καρδιολογικός Σύλλογος (4) ταξινομεί τις αθηροσκληρυντικές βλάβες στον ανθρώπους σε 8 τύπους (**Σχήμα 1**). Οι τύπου I και II βλάβες χαρακτηρίζονται ως πρώιμες αλλοιώσεις, οι τύπου III ως ενδιάμεσες αλλοιώσεις και οι τύπου IV-VIII ως προχωρημένες αλλοιώσεις.

Σχήμα 1. Ταξινόμηση αθηροσκληρωτικών βλαβών (4) (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000)



Τύποι αθηρωματικών βλαβών

Τύπου I (αρχική) βλάβη

Η βλάβη τύπου I αποτελεί την πρώτη ανίχνευση εναπόθεσης λιπιδίων στον έσω χιτώνα μικροσκοπικά και χημικά. Συναντάται πιο συχνά σε βρέφη και παιδιά αλλά έχει παρατηρηθεί και σε ενήλικες με ήπια αθηροσκλήρυνση. Οι αρχικές ιστολογικές μεταβολές στον έσω χιτώνα του ανθρώπου είναι ελάχιστες και περιλαμβάνει

απομονωμένες ομάδες μακροφάγων που περιέχουν λιπίδια (απομονωμένα μακροφάγα αφρωδών κυττάρων). Στα στεφανιαία αγγεία αυτά τα κύτταρα συγκεντρώνονται σε περιοχές του έσω χιτώνα που έχουν προσαρμοστική πάχυνση έκκεντρου τύπου (5-7). Η ύπαρξη των απομονωμένων μακροφάγων αφρωδών κυττάρων είναι ένας κυτταρικός δείκτης παθολογικής συγκέντρωσης αθερογόνων λιποπρωτεϊνών, κυρίως στις περιοχές με προσαρμοστική πάχυνση του έσω χιτώνα.

Τύπου II βλάβη

Στην τύπου II βλάβη το αρχικό εύρημα είναι οι λιπώδεις γραμμώσεις που αντιστοιχούν σε υποκίτρινες επιμήκεις υπεργέρσεις του έσω χιτώνα, διαμέτρου 1 χιλιοστού έως 1.5 εκατοστού, φερόμενες κατά τον επιμήκη άξονα του αγγείου. Μικροσκοπικά συνίστανται σε άθροιση αφρωδών κυττάρων με κεντοπιώδες κυτταρόπλασμα και όχι σε απομονωμένες ομάδες κυττάρων, τα οποία προέρχονται τόσο από μονοκύτταρα όσο και από λείες μυϊκές ίνες των αγγείων. Στην βλάβη τύπου II η πλειοψηφία των λιπιδίων βρίσκεται μέσα στα κύτταρα και κυρίως στα μακροφάγα αφρώδη κύτταρα ενώ ένα μικρότερο ποσοστό των λιπιδίων τοποθετείται στον εξωκυττάριο χώρο. Τα λιπίδια αποτελούνται από εστέρες χοληστερόλης (77%), χοληστερόλη και φωσφολιπίδια. Οι τύπου II βλάβες διακρίνονται σε βλάβες που τείνουν να εξελιχθούν, οι οποίες αναπτύσσονται σε περιοχές προσαρμοσμένης πάχυνσης του έσω χιτώνα και σε βλάβες που τείνουν να παραμείνουν σταθερές οι οποίες είναι λεπτές, περιέχουν λίγα λεία μυϊκά κύτταρα και τοποθετούνται στον έσω χιτώνα. Η εξέλιξη του τύπου II βλάβης εξαρτάται από διάφορες μηχανικές δυνάμεις που δρουν στο αρτηριακό τοίχωμα όπως η διατμητική τάση (shear stress).

Τύπου III βλάβη

Η τύπου III βλάβη γνωστή και ως ενδιάμεση βλάβη χαρακτηρίζεται ως μια μεταβατική βλάβη καθώς αποτελεί μορφολογική γέφυρα από τη βλάβη τύπου II στη βλάβη τύπου IV ή αλλιώς αθήρωμα. Καλούνται αλλιώς και προ-αθηρώματα. Συνίστανται από λεία μυϊκά κύτταρα και περιβάλλεται από εξωκυττάρια ουσία συνδετικού ιστού και εξωκυττάρια σταγονίδια λιπιδίων.

Τύπου IV βλάβη

Στην τύπου IV βλάβη τα σταγονίδια των λιπιδίων του εξωκυττάριου χώρου σχηματίζουν την λιπώδη κάψα. Η τύπου IV βλάβη γνωστή και ως αθήρωμα είναι η πρώτη βλάβη στην ταξινόμηση των προχωρημένων πλακών λόγω της σοβαρής αποδιοργάνωσης του έσω χιτώνα από την λιπώδη κάψα. Αρχικά το αθήρωμα είναι μια έκκεντρη βλάβη. Η λιπώδης κάψα παχύνει το αρτηριακό τοίχωμα και μπορεί να είναι ορατή με γυμνό μάτι σε ιστοτεμάχιο. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι προκαλεί απαραίτητα και στένωση του αρτηριακού αυλού καθώς η πάχυνση μπορεί να σχετίζεται με αύξηση του εξωτερικού ορίου της αρτηρίας. Τα λεία μυϊκά κύτταρα και η ενδοκυττάρια ουσία είναι διασκορπισμένη και την θέση της έχουν πάρει συσσωρευμένα μόρια εξωκυττάριων λιπιδίων. Μεταξύ της λιπώδους κάψας και της επιφάνειας του ενδοθηλίου ο έσω χιτώνας περιέχει μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα με ή χωρίς σταγονίδια λιπιδίων, λεμφοκύτταρα, μαστοκύτταρα και πρωτεογλυκάνες . Οι βλάβες αυτές παρόλο που μπορεί να μην εμφανίζουν στενωτικά φαινόμενα μπορεί να είναι ευάλωτες σε ρήξη λόγω της περίσσειας μακροφάγων στην περιφέρεια. Όταν αυτή η λιπώδης κάψα παρουσιάσει αύξηση του ινώδους ιστού (κυρίως του κολλαγόνου) η βλάβη χαρακτηρίζεται ως τύπου V βλάβη.

Τύπου V βλάβη

Βλάβη τύπου V χαρακτηρίζεται η βλάβη όπου ένα μεγάλο μέρος της ινομώδους κάψας διακόπτεται από συσσωρευμένα λιπίδια, αιμάτωμα και εναποθέσεις οργανωμένου θρόμβου. Μέρη της κάψας αποτελούνται από ενδοπλασματικό δίκτυο, πλούσιο σε λεία μυϊκά κύτταρα και ίνες κολλαγόνου. Τα καινούρια αυτά στρώματα που δημιουργούνται προκαλούν προς τα έξω επέκταση του αρτηριακού τοιχώματος, καθώς και στένωση του αρτηριακού αυλού.

Τύπου VI βλάβη

Οι τύπου VI βλάβες χαρακτηρίζονται και ως επιπλεγμένες βλάβες. Τα ιστολογικά κριτήρια της τύπου VI βλάβης αποτελούν ένα ή περισσότερα από επιφανειακή διάβρωση, αιμάτωμα και θρόμβωση.

Τύπου VII βλάβη

Ως τύπου VII βλάβη χαρακτηρίζεται η επιπλεγμένη βλάβη που αποτιτανώνεται.

Τύπου VIII βλάβη

Ως τύπου VIII βλάβη χαρακτηρίζεται η ινώδης πλάκα με μικρό ή καθόλου λιπιδικό πυρήνα και ήπιες αποτιτανώσεις.

Φάσεις αθηροσκληρυντικών βλαβών

Ο Αμερικανικός καρδιολογικός σύλλογος κατηγοριοποιεί περαιτέρω τις αθηροσκληρυντικές βλάβες σε 5 φάσεις (8).

Η φάση 1 αφορά μικρές βλάβες τύπου I,II και III σε άτομα ηλικίας κάτω των 30 ετών και είναι ασυμπτωματικές.

Η φάση 2 αφορά πλάκες που μπορεί να μην προκαλούν στένωση, αλλά να έχουν τάση για διάβρωση λόγω του υψηλού φορτίου λιπιδίων. Οι πλάκες αυτές είναι τύπου IV ή τύπου V. Συνήθως είναι ασυμπτωματικές αλλά μπορεί να εμφανίσουν σταθερή στηθάγχη.

Η φάση 3 αφορά πλάκες τύπου IV ή V όπου συμβαίνει ρήξη, καταλήγοντας σε μη αποφρακτικό τοιχωματικό θρόμβο και στη ξαφνική ανάπτυξη επιπλεγμένης αλλοίωσης (τύπου VI). Η φάση αυτή είναι συνήθως ασυμπτωματική αλλά μπορεί να εκδηλωθεί και στηθάγχη.

Η φάση 4 αφορά την οξεία επιπλεγμένη βλάβη τύπου VI και τη δημιουργία αποφρακτικού θρόμβου που έχει ως αποτέλεσμα το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο.

Η φάση 5 αφορά βλάβες που υφίστανται διάβρωση με δημιουργία τοιχωματικού θρόμβου μέσω του συνδετικού ιστού, οι οποίες μπορούν να εξελιχθούν σε αποφρακτικές και ινωτικές βλάβες τύπου VII ή VIII και να προκαλέσουν στηθάγχη ή ακόμα και να είναι ασυμπτωματικές λόγω ανάπτυξης παράπλευρης κυκλοφορίας.

2.2 Παθοφυσιολογία αθηροσκλήρυνσης.

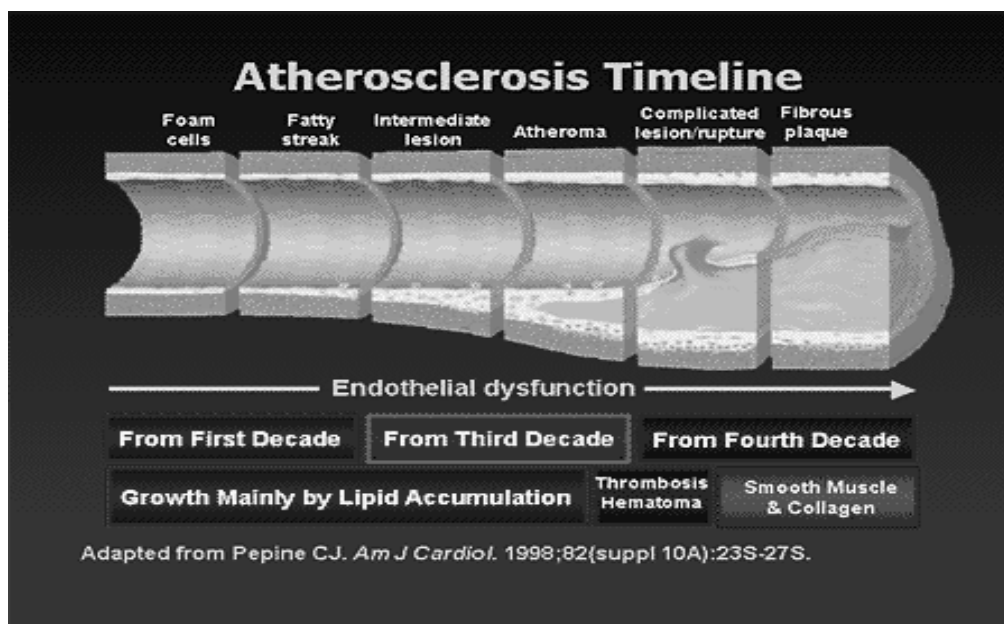
Η παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρυνσης μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις: στην έναρξη, στην εξέλιξη και στις επιπλοκές. Το φυσιολογικό αρτηριακό τοίχωμα αποτελείται από τρεις στοιβάδες ή χιτώνες τον έξω, τον μέσο και τον έσω μυϊκό χιτώνα. Ο έξω μυϊκός χιτώνας αποτελείται από νευρικές απολήξεις, μαστοκύτταρα και τροφικά αγγεία (vasa vasorum), μικρά αγγεία που θρέφουν την εξωτερική στοιβάδα του μέσου χιτώνα. Ο μέσος χιτώνας βρίσκεται κάτω από τη μέση και έσω ελαστική μεμβράνη. Έχει καλά αναπτυγμένες ομόκεντρες στοιβάδες λείων μυϊκών κυττάρων που χωρίζονται από στοιβάδες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας πλούσιας σε ελαστίνη, από κολλαγόνο και από άλλα μακρομόρια. Ο έσω χιτώνας αρχικά αποτελείται από ένα μονοστοίβαδο ενδοθηλιακών κυττάρων που ακουμπούν στην βασική μεμβράνη που αποτελείται από μη ινώδεις τύπους κολλαγόνου, όπως το κολλαγόνο τύπου IV, την λαμινίνη, την φιβρονεκτίνη και άλλα μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, και η δομή του εξελίσσεται στο χρόνο. Με την γήρανση δημιουργούνται περισσότερες στοιβάδες λόγω μετανάστευσης των λείων μυϊκών κυττάρων από τον μέσο χιτώνα και τον πολλαπλασιασμό αυτών, ενώ στην συνέχεια παράγουν συστατικά εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως κολλαγόνο τύπου II και III. Η παρουσία ενός πολύπλοκου έσω χιτώνα γνωστό ως ενδοθηλιακή πάχυνση χαρακτηρίζει τις περισσότερες αρτηρίες των ενήλικων.

Στην πρώιμη φάση σχηματισμού της αθηροσκλήρυνσης, τα μόρια της χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλης (LDL) συσσωρεύονται στον έσω χιτώνα όπου οξειδώνονται. Τα συστατικά των οξειδωμένων μορίων της LDL μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή και για αυτό η χρόνια έκθεση της αρτηρίας στην LDL φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης. Στη συνέχεια προ φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα εισέρχονται στον έσω χιτώνα. Τα μονοκύτταρα που κυκλοφορούν στο πλάσμα προσδένονται σε μόρια προσκόλλησης που ενεργοποιούνται από ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι κυτοκίνες ή αλλιώς χυμοκίνες ευνοούν την μετακίνηση των προσκολλημένων μονοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα και από εκεί ωριμάζουν σε μακροφάγα. Έτσι εκφράζονται διάφοροι υποδοχείς όπου επιτρέπουν την σύνδεση των μακροφάγων με τις λιποπρωτεΐνες και τον σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων. Επιπλέον στον έσω χιτώνα εισέρχονται T λεμφοκύτταρα, τα οποία ρυθμίζουν την λειτουργία των

κυττάρων φυσικής ανοσίας , των ενδοθηλιακών κυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων. Τα λεία μυϊκά κύτταρα του μέσω χιτώνα μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα μέσω των συσσωρευμένων λευκοκυττάρων .

Στις αρχικές βλάβες συμπεριλαμβάνονται η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η απορρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης, η δυσμενής αναδιαμόρφωση του αρτηριακού τοιχώματος και η πάχυνση του έσω-μέσου χιτώνα σε επίπεδα κάτωθεν των επισήμων ορίων για το χαρακτηρισμό της αθηρωματικής πλάκας. Οι αθηροσκληρυντικές βλάβες είναι αποτέλεσμα διαφόρων παθολογικών διαδικασιών όπως ο σχηματισμός και ο θάνατος μακροφάγων αφρωδών κυττάρων, η μείωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και των λείων μυϊκών κυττάρων, η χρόνια φλεγμονή, η νεοαγγειογένεση , η διάσπαση της επιφάνειας της βλάβης και ο σχηματισμός αιματώματος και θρόμβου στον ινομυώδη ιστό. Στην ανάπτυξη και εξέλιξη των βλαβών μπορούν να εμπλέκονται διάφοροι παθολογικοί μηχανισμοί είτε ταυτόχρονα είτε διαδοχικά (9) . Χαρακτηριστικό των αθηροσκληρυντικών πλακών είναι η εξέλιξή τους με την πάροδο του χρόνου (10) (**Εικόνα 1**).

Εικόνα 1. Χρονική εξέλιξη της βαρύτητας της αθηρωματικής νόσου.



Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Για δεκαετίες το ενδοθήλιο αντιπροσώπευε απλά έναν ημιδιαπερατό φραγμό ανάμεσα στο αίμα και στους διάμεσους ιστούς. Τα τελευταία χρόνια όμως αποκαλύφθηκε ένα τεράστιο φάσμα ομοιοστατικών λειτουργιών τις οποίες εκτελεί, λειτουργώντας ως αυτοκρινικό και παρακρινικό όργανο (11,12). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα «αντιλαμβάνονται» τις αλλαγές στις αιμοδυναμικές συνθήκες καθώς και στο ορμονικό τους περιβάλλον και απαντούν με σύνθεση και απελευθέρωση βιολογικά ενεργών ουσιών. Εκτός από τις γενικές αυτές λειτουργίες το ενδοθήλιο ανάλογα με τη θέση του, έχει ρόλους ειδικούς για τα όργανα στα οποία βρίσκεται. Για παράδειγμα στον πνεύμονα συμμετέχει στην ανταλλαγή αερίων ενώ στο ήπαρ και τον σπλήνα στην φαγοκυττάρωση (11). Η μελέτη της δομής και λειτουργίας του ενδοθηλίου γίνεται με πειράματα σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων και σε ζώα, καθώς και με κλινικές μελέτες σε ανθρώπους. Οι λειτουργίες που επιτελεί το ενδοθήλιο περιλαμβάνουν τη διατήρηση του αγγειακού τόνου, τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών που οδηγεί στην αναδιαμόρφωση (remodeling) του αγγειακού τοιχώματος, την αιμόσταση και την αντιφλεγμονώδη δράση. Το αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου είναι η διακοπή ή η αναστροφή των φυσιολογικών ομοιοστατικών λειτουργιών του. Η αρχική βλάβη ξεκινά από τον τραυματισμό του ενδοθηλίου, συνήθως μέσω οξειδωτικής ή χημικής προσβολής ή αυξημένης διατμητικής τάση που οδηγεί σε ενεργοποίηση κυτοκινών, αύξηση της συγκολλητικότητας και της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα και στη συνέχεια σε διαταραχή της ενδοθήλιο-εξαρτώμενης αγγειοκινητικής δραστηριότητας, τάση για θρομβογένεση και τελικά σε αγγειακή αναδιαμόρφωση (13,14).

Η υπόθεση ότι η βλάβη του ενδοθηλίου σχετίζεται με τη γένεση της αθηροσκλήρυνσης έχει ήδη διατυπωθεί από τη δεκαετία του '70, όταν παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαταραχές στη δομή και την οργάνωση ενδοθηλιακών κυττάρων της αορτής σε θέσεις πρώιμων λιπιδιακών ραβδώσεων (fatty streaks) (15). Τα τελευταία χρόνια, σε μελέτες που έγιναν σε ζώα, αλλά και σε ανθρώπους πάσχοντες από καρδιαγγειακή νόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η δομική αυτή διαταραχή του ενδοθηλίου συνοδεύεται και από διαταραχή της λειτουργίας του, κυρίως με τη μορφή διαταραχής της ενδοθήλιο-εξαρτώμενης

αγγειοδιαστολής (13). Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου υπάρχει και σε πολύ πρώιμα στάδια αθηροσκλήρυνσης, πριν ακόμη γίνει έκδηλη κλινικά η νόσος: Ακόμη και όταν παραμένει φυσιολογική η λειτουργία του μυϊκού χιτώνα του αγγείου (αγγειοδιαστολή μετά την χορήγηση νιτροδών) και πριν εμφανισθούν υπερηχογραφικά δομικές αλλοιώσεις του αγγειακού τοιχώματος, αρκεί να υπάρχει μόνο οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου ή σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (16,17,18,19). Ακόμη έχειδειχθεί, ότι η έκταση της αθηροσκλήρυνσης σχετίζεται με το βαθμό της διαταραχής της ενδοθήλιο-εξαρτώμενης αγγειοδιαστολής και την αναστολή των συνθασών του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) (20). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε συνδυασμό με τους κύριους προδιαθεσικούς παράγοντες καρδιαγγειακής νόσου, όπως υπερχοληστεριναιμία, υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη, γήρανση, κάπνισμα, έλλειψη οιστρογόνων, καθώς και με γενετικές διαταραχές, όπως υπερομοκυστεϊναιμία και οικογενειακή υπερχοληστεριναιμία (21,22,23,24,25,26,27, 28,29). Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μπορεί να προκληθεί και οξέως, μετά από βραχυπρόθεσμη επίδραση παραγόντων κινδύνου (30,31). Η χορήγηση L-NMMA (αναστολέα σύνθεσης NO) δεν επιδεινώνει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στεφανιαίων αρτηριών ατόμων με παράγοντες κινδύνου ή με εγκατεστημένη αθηροσκλήρυνση. Αντίθετα, σε υγιή άτομα χωρίς παράγοντες κινδύνου, η χορήγηση L-NMMA προκαλεί διαταραχή της ενδοθηλιακής λειτουργίας των αρτηριών αγωγών και της μικροκυκλοφορίας της καρδιάς (14).

2.3 Μηχανισμοί αθηροσκλήρυνσης

Επίδραση των αιμοδυναμικών παραμέτρων και αθηροσκλήρυνση

Έχει παρατηρηθεί ότι η αθηροσκλήρυνση αναπτύσσεται σε συγκεκριμένα σημεία του αρτηριακού δέντρου, όπως στα πλάγια τοιχώματα των σημείων διακλάδωσης, στα πλάγια τοιχώματα των διχασμών και στο έσω τμήμα των καμπών, σημεία στα οποία παρατηρείται διαταραχή στην αιματική ροή, γεγονός που επιβεβαιώνει τον κεντρικό ρόλο των αιμοδυναμικών παραμέτρων στην αθηρογένεση (32). Οι τοπικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην αθηροσκλήρυνση είναι η προκαλούμενη από την αρτηριακή πίεση τοιχωματική τάση και η προκαλούμενη από την ροή αίματος διατμητική τάση. Οι κύριες τάσεις που ασκούνται στο αγγείο είναι αυτές με αξονική κατεύθυνση, δηλαδή παράλληλες με την επιφάνεια του αγγείου και καλούνται

διατμητικές (shear stress) και αυτές με ακτινική κατεύθυνση που καλούνται εφελκυστικές (tensile stress) (33). Οι περιοχές που επηρεάζονται κυρίως είναι η κοιλιακή αορτή, οι στεφανιαίες αρτηρίες, οι λαγονομηριαίες αρτηρίες και οι διχασμοί των καρωτίδων. Η χαμηλή διατμητική τάση συμβάλει στην ανάπτυξη και ευαλωτότητα της πλάκας μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως: την συγκέντρωση λιπιδίων, μακροφάγων και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων, την υπερέκφραση μορίων διάχυσης και πρωτεασών, την μείωση των σταθεροποιητικών ινών του κολλαγόνου, την αύξηση του νεκρωτικού πυρήνα, την λέπτυνση της ινώδους κάψας και των αλλοιώσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό αυτές τις συνθήκες διαδράμουν σημαντικό ρόλο μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών όπως την έκφραση γονιδίων και την προσκόλληση ουδετερόφιλων.

Η διατμητική τάση από μόνη της δεν αρκεί για να προκαλέσει ρήξη πλάκας. Ένας άλλος αιμοδυναμικός παράγοντας που φαίνεται να παίζει ρόλο στην ευαλωτότητα και στην ρήξη της πλάκας όπως προαναφέρθηκε είναι η εφελκυστική τάση του τοιχώματος (33). Η εφελκυστική τάση είναι μεγαλύτερη στο εγγύς τμήμα των στεφανιαίων αρτηριών και για αυτό η συχνότητα της ρήξης πλάκας στο εγγύς τμήμα των αρτηριών είναι μεγαλύτερη από αυτή στην περιφέρεια.

Φλεγμονή και λιποπρωτεΐνες

Η συσσώρευση χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) στο αρτηριακό τοίχωμα μπορεί να προκαλέσει αθηροσκλήρυνση μέσω της οξειδωσής της. Η τροποποιημένη και οξειδωμένη LDL δρα ως χρόνιο ερέθισμα φυσικής και επίκτητης ανοσίας. Με αυτό τον τρόπο προκαλούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα να εκφράσουν μόρια προσκόλλησης, χημειοτακτικές πρωτεΐνες- χυμοκίνες και αυξητικούς παράγοντες τα οποία αλληλοεπιδρούν με τους υποδοχείς στα μονοκύτταρα και ρυθμίζουν την μετανάστευση αυτών και την διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα.

Επιπλέον η σύνδεση της LDL με τις πρωτεογλυκάνες του έσω χιτώνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της νόσου. Με την πρόοδο της νόσου το ενδοθήλιο γίνεται πιο διαπερατό και η έκφραση μορίων σύνδεσης ευνοεί την περαιτέρω κατακράτηση της LDL.

Τα μακροφάγα εκφράζονται με διάφορους φαινότυπους και διαφοροποιούνται ως προς την ανάπτυξη της βλάβης σε δύο κύριους τύπους: τα M1 και τα M2 μακροφάγα. Τα M1 μακροφάγα έχουν προ φλεγμονώδη φαινότυπο και χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση προ φλεγμονωδών κυτοκινών, iNOS, ενζύμων και από την παραγωγή ελευθέρων ριζών που ευνοούν περαιτέρω την κατακράτηση και την τροποποίηση της LDL όπως και άλλοι μεσολαβητές που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρυνση όπως το πλασμινογόνο, οι καθεψίνες και οι μεταλλοπρωτεάσες. Αντίθετα τα M2 μακροφάγα έχουν αντιφλεγμονώδη φαινότυπο. (34).

Εκτός από την εγγενή ανοσία σημαντικό ρόλο παίζει και η επίκτητη ανοσία στην εξέλιξη της πλάκας (35). Στην αθηρωματική πλάκα εκτός από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να παρουσιάσουν αντιγόνα και στα T κύτταρα. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα ή ενδοθηλιακά κύτταρα) επιτρέπουν την αλληλεπίδραση του αντιγόνου με τα T κύτταρα με τρόπο που προκαλούν την ενεργοποίησή τους και τα οποία στην συνέχεια εκκρίνουν άφθονες ποσότητες κυτοκινών οι οποίες ρυθμίζουν την αθηρογένεση.

Το μονοκύτταρο από την στιγμή που μεταναστεύει στον αρτηριακό έσω χιτώνα μπορεί να αφομοιώσει λιπίδια και να μετατραπεί σε αφρώδες κύτταρο ή μακροφάγο πλήρες λιπιδίων. Τα περισσότερα κύτταρα μπορούν να εκφράσουν τον κλασσικό LDL μεμβρανικό υποδοχέα ο οποίος όμως δεν μεσολαβεί στην συνάθροιση αφρωδών κυττάρων και αντί αυτού διάφορα μόρια γνωστά ως υποδοχείς καθαριστές (scavenger receptors) φαίνονται να σχετίζονται με την πρόσληψη πλεοναζόντων λιπιδίων, χαρακτηριστικό γνώρισμα των αφρωδών κυττάρων.

Τα αφρώδη κύτταρα είναι ορατά με το μικροσκόπιο. Αρχικά αυξάνονται στην έσω στοιβάδα του αγγειακού τοιχώματος και όταν σχηματιστούν αρκετά στρώματα μπορούν να διακριθούν ως κιτρινόχροα ξανθώματα ή λιποειδείς γραμμώσεις. Οι λιποειδείς αυτές γραμμώσεις είναι αναστρέψιμες εάν εξαλειφθεί η αιτία που τις προκάλεσε.

Σχηματισμός νεκρωτικού πυρήνα

Πολλά από τα ξανθώματα δεν εξελίσσονται περαιτέρω ενώ άλλα, ειδικά αυτά που αναπτύσσονται σε ειδικά εστιακά σημεία εξελίσσονται σε αθηροσκληρυντικές βλάβες. Χαρακτηριστικό τους είναι το ακυτταρικό πλούσιο σε λιπίδια υλικό στον έσω χιτώνα. Αρχικά δεξαμενές λιπιδίων βρίσκονται κάτω από τις στοιβάδες των αφρωδών κυττάρων χωρίς να διαταράσσουν την δομή του έσω χιτώνα. Αυτού του τύπου η βλάβη χαρακτηρίζεται ως πάχυνση του έσω χιτώνα και παρατηρείται σε στεφανιαία αγγεία ατόμων ηλικίας 20 έως 30 (36). Σε κάποιες βλάβες αυτές οι δεξαμενές λιπιδίων μέσω της εισβολής των μακροφάγων εξελίσσονται σε νεκρωτικούς πυρήνες διακόπτοντας την φυσιολογική δομή του έσω χιτώνα και καλούνται ινοαθηρώματα.

Η απόπτωση και η δευτεροπαθής νέκρωση των αφρωδών κυττάρων και των λείων μυϊκών ινών είναι ένας επιπλέον πιθανός μηχανισμός ανάπτυξης νεκρωτικού πυρήνα. Η χημική σύσταση του νεκρωτικού πυρήνα μαρτυρά ότι και άλλες πηγές λιπιδίων πιθανώς συνεισφέρουν στην ανάπτυξη νεκρωτικού πυρήνα όπως η συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης και ελεύθερης χοληστερόλης ερυθροκυτταρικής μεμβράνης προερχόμενη από ενδοπλακική αιμορραγία.

Αγγειογένεση και ενδοπλακική αιμορραγία

Τα νεοαγγεία κυρίως προέρχονται από τα τροφικά αγγεία του εξωτερικού χιτώνα και σχηματίζουν δίκτυα για την κυκλοφορία μονοκυττάρων και λευκοκυττάρων. Το κύριο ερέθισμα για τον σχηματισμό των νεοαγγείων είναι παράγοντες που εκκρίνονται σε συνθήκες υποξίας, από υποξικά μακροφάγα στους νεκρωτικούς πυρήνες (37). Τα μικροαγγεία της πλάκας μπορεί να είναι εύθρυπτα, να προκαλούν εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος και των ερυθροκυττάρων και να είναι επιρρεπή σε ρήξη (38). Αυτές οι ενδοπλακικές αιμορραγίες είναι συνήθεις στα ινοαθηρώματα και μπορούν να επεκτείνουν το νεκρωτικό πυρήνα και να προάγουν την φλεγμονή. Άλλη αιτία ενδοπλακικής αιμορραγίας είναι η εξαγγείωση αίματος από ρήξη της ινώδους κάψας (39).

Ίνωση και ασβέστωση

Ο αρχικός συνδετικός ιστός των βλαβών είναι αυτός του φυσιολογικού έσω χιτώνα, ο οποίος σταδιακά αντικαθίσταται από ινώδη ιστό πλούσιο σε κολλαγόνο, το οποίο μπορεί να επεκταθεί τόσο ώστε να αποτελεί το κύριο συστατικό της πλάκας. Οι ιστοί που βρίσκονται ανάμεσα από τον νεκρωτικό πυρήνα και την επιφάνεια του αυλού (την ινώδη κάψα) είναι ινώδεις ιστοί πλούσιοι σε κολλαγόνο τύπου I. Το κολλαγόνο, η ελαστίνη και οι πρωτεογλυκάνες εκκρίνονται από συνθετικά λεία μυϊκά κύτταρα. Σε αντίθεση με τα τυπικά λεία μυϊκά κύτταρα τα οποία είναι ανενεργά στον κυτταρικό κύκλο, τα συνθετικά εμφανίζουν έντονο πολλαπλασιασμό και μεταναστεύουν κάτω από την επίδραση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων (40).

Οι πλάκες καθώς εξελίσσονται αναπτύσσουν περιοχές ασβεστοποίησης. Από τις πρώτες μικροσκοπικές περιγραφές της αθηροσκλήρυνσης ο Virchow είχε αναγνωρίσει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα του σχηματισμού των οστών στις αθηρωματικές πλάκες. Κάποιοι υποπληθυσμοί των λείων μυϊκών κυττάρων φαίνεται να προάγουν την ασβεστοποίηση ενισχύοντας την έκκριση κυτοκινών, όπως οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών. Η αγγειακή ασβέστωση σε αντίθεση με το σχηματισμό των οστών πυροδοτείται από την φλεγμονή.

Η ασβέστωση είναι συχνή στην εξέλιξη των αθηροσκληρυντικών βλαβών και αυξάνεται με την ηλικία. Μέσα στην πλάκα διακρίνονται δύο μορφολογίες ασβέστωσης στον έσω χιτώνα, οι αρχικών σταδίων μικροασβεστώσεις και οι τελικού σταδίου μακροασβεστώσεις. Οι μικροασβεστώσεις δημιουργούνται στα αρχικά στάδια στις δεξαμενές λιπιδίων και προάγουν την φλεγμονώδη απάντηση με αποτέλεσμα την αστάθεια της πλάκας. Αντίθετα, οι μακροασβεστώσεις ασκούν σταθεροποιητικές ιδιότητες στην πλάκα (41).

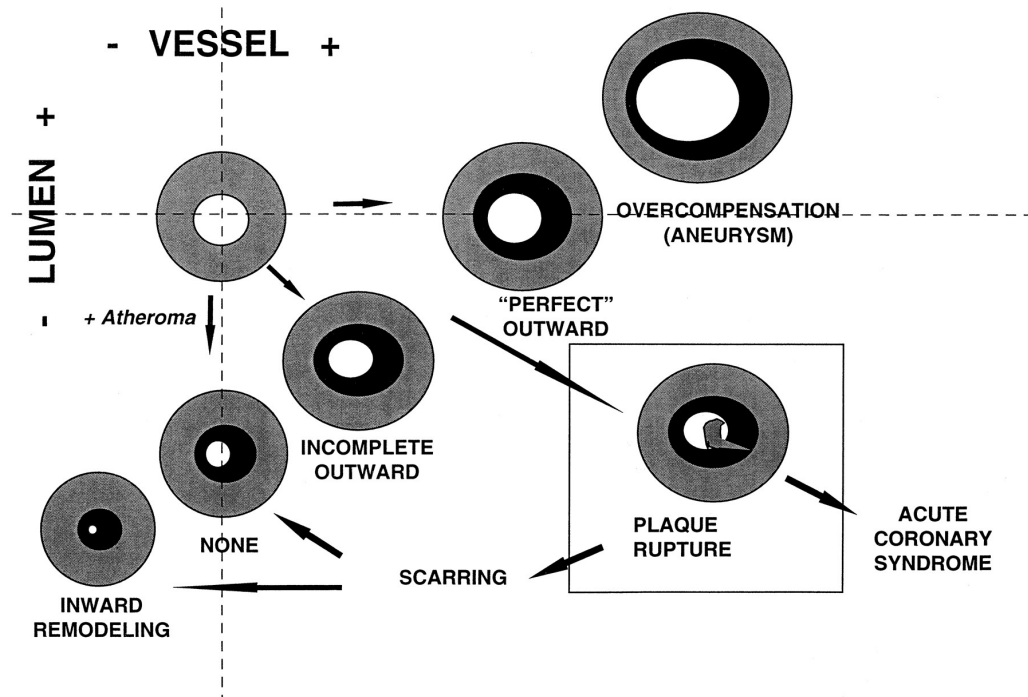
Αρτηριακή αναδιαμόρφωση

Ο όρος αρτηριακή αναδιαμόρφωση αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει κάθε αλλαγή στην δομή του αρτηριακού τοιχώματος του αγγείου, αλλά πια χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της αλλαγής στο μέγεθος του αγγείου. Η αναδιαμόρφωση του αγγείου μπορεί να είναι θετική-επεκτατική ή αρνητική - περιοριστική (42). Η ορολογία ποικίλλει όπως φαίνεται στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Ορολογία αρτηριακής αναδιαμόρφωσης

Change in vessel size synonyms	
Increase	Decrease
Outward Remodeling	Inward remodeling
Compensatory enlargement	(Paradoxical) shrinkage
Positive remodeling	Negative remodeling
Expansive remodeling	Constrictive remodeling
Glagovian remodeling	Antiglagovian remodeling

Κατά την αθηρογένεση το αγγείο αναδιαμορφώνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να μην προκαλείται στένωση του αυλού μέχρι να μεγαλώσουν αρκετά οι πλάκες (επεκτατική αναδιαμόρφωση). Στένωση του αυλού σχηματίζεται με την ανάπτυξη των αθηρωματικών πλακών ή και την συρρίκνωση του αγγείου (συμπιεστική αναδιαμόρφωση) (**Εικόνα 2**). Στην επεκτατική αναδιαμόρφωση φαίνεται να εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες όπως πρωτεάσες, αυξητικοί παράγοντες και φλεγμονώδη κύτταρα μέσω της παραγωγής μεταλλοπρωτεασών. Η επεκτατική αναδιαμόρφωση παρατηρείται πιο συχνά στα ινοαθηρώματα και σχετίζεται με την φλεγμονή, την ατροφία του μέσου χιτώνα και το μέγεθος του νεκρωτικού πυρήνα και για αυτό έχει συσχετιστεί με την ρήξη πλάκας και επομένως με ασταθή στηθάγχη, έμφραγμα του μυοκαρδίου και αιφνίδιο θάνατο (42).



Εικόνα 2. Σχέση μεταξύ της ρήξης πλάκας και της επεκτατικής αναδιαμόρφωσης. Εικόνα από Michael R. Ward Arterial remodeling. Circulation 2000 (42).

2.4 Επιπλοκές αθηροσκλήρυνσης

Μηχανισμοί ρήξης, διάβρωσης και θρόμβωσης.

Η αθηροσκλήρυνση σε προχωρημένα στάδια μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην ροή αίματος των στεφανιαίων αγγείων με συμπτωματολογία σταθερής στηθάγχης. Το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο σχεδόν πάντα οφείλεται σε θρόμβο στον αυλό της αρτηρίας ή σε αιμορραγία πλάκας με ή χωρίς συνοδό αγγειοσπασμό. Στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST διαστήματος ο θρόμβος είναι συνήθως αποφρακτικός και επίμονος, ενώ στην ασταθή στηθάγχη και στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάσπαση του ST διαστήματος ο θρόμβος συνήθως είναι ατελής, δυναμικός ή και απών.

Η ρήξη της πλάκας είναι η πιο συχνή αιτία θρόμβωσης. Στην ρήξη πλάκας μέσω λύσης της συνέχειας της ινώδους κάψας εκτίθεται ο θρομβογενετικός πυρήνας στο αίμα. Σε σπάνιες περιπτώσεις έχουν ενοχοποιηθεί ασβεστομένα οξίδια ως αναρκτήριοι μηχανισμοί θρόμβωσης. Στην περίπτωση που η ρήξη δεν μπορεί να

επιβεβαιωθεί με απεικονιστικό ή μικροσκοπικό έλεγχο χρησιμοποιείται ο όρος διάβρωση.

Μηχανισμοί ρήξης πλάκας

Η ρήξη πλάκας πραγματοποιείται στο πιο λεπτό τοίχωμα της κάψας με την μεγαλύτερη διήθηση σε μακροφάγα. Σε έκκεντρες πλάκες το πιο ευάλωτο σημείο είναι οι περιοχές ανάκαμψης της πλάκας (shoulder region). Σε αυτοψία μετά από αιφνίδιο θάνατο λόγω ρήξης πλάκας το 95% των ριγμένων πλακών είχαν πάχος ινώδους κάψας μικρότερο από 65μm και έτσι αυτές οι βλάβες στα στεφανιαία αγγεία χαρακτηρίστηκαν ως ινοαθηρώματα λεπτής κάψας (thin cap fibroatheromas TCFAs) (43). Οι βλάβες με αυτά τα χαρακτηριστικά καλούνται και ως ευάλωτες πλάκες ενώ αντίθετα οι σταθερές πλάκες χαρακτηρίζονται από μικρότερη συσσώρευση λιπιδίων και πιο παχιές κάψες.

Στην λέπτυνση και στην ρήξη της πλάκας υπάρχει μια έλλειψη ισορροπίας μεταξύ των δυνάμεων που ασκούνται στην επιφάνεια της πλάκας και της μηχανικής δύναμης της ινώδους κάψας. Οι ενδιάμεσες μορφές του κολλαγόνου αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της αντίστασης στη ρήξη της ινώδους κάψας. Η μείωση των λείων μυϊκών ινών που συνθέτουν το κολλαγόνο και η αυξημένη διήθηση από μακροφάγα που συμβάλλουν στην αποδόμηση του κολλαγόνου είναι οι κύριοι μηχανισμοί λέπτυνσης και ρήξης της ινώδους κάψας.

Φλεγμονώδεις παράγοντες μεσολάβησης μπορούν να προκαλέσουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των λείων μυϊκών κυττάρων με αποτέλεσμα την μείωση αυτών σε περιοχές τοπικής φλεγμονής της πλάκας και επομένως μείωση της σύνθεσης κολλαγόνου, ενώ επιπλέον παράγοντες όπως η προερχόμενη από T κύτταρα κυτοκίνη (ιντερφερόνη-γ) αναστέλλει ισχυρά τη σύνθεση του κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα. Οι ριγμένες πλάκες συνήθως είναι έντονα διηθημένες από μακροφάγα αφρώδη κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν πρωτεολυτικά ένζυμα όπως ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, καθειψίνες και μεταλλοπρωτεϊνάσες τα οποία διασπούν το κολλαγόνο και την ελαστίνη της αρτηριακής εξωκυττάριας ουσίας (44). Η ρήξη της πλάκας μπορεί να πυροδοτηθεί και μέσω ερεθισμάτων όπως η ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος, με αύξηση της καρδιακής συχνότητας και της αρτηριακής πίεσης, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε ρήξη πλάκας ή σε

αύξηση της πηκτικότητας και της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων. Έτσι δημιουργούνται συνθήκες ιδιαίτερα θρομβογόνες σε ήδη ριγμένες πλάκες (45).

Μηχανισμοί διάβρωσης πλάκας

Η παθοφυσιολογία της επιφανειακής διάβρωσης και οι μηχανισμοί που οδηγούν στον σχηματισμό θρόμβου χωρίς ρήξη είναι λιγότερο καλά κατανοητοί. Η διάβρωση της πλάκας είναι υπεύθυνη σχεδόν για το ένα τέταρτο των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων (46). Η διάβρωση χαρακτηρίζεται από απουσία ή διαταραχή του ενδοθηλίου της πλάκας, η οποία χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό κυρίως λείων μυϊκών κυττάρων από ότι φλεγμονωδών κυττάρων και από την παρουσία πρωτεογλυκανών και μικρών νεκρωτικών πυρήνων. Μεταβολές έχουν παρατηρηθεί και στις ιδιότητες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας λόγω αύξησης του τύπου III κολλαγόνου και της υαλουρονάνης (47). Μέσω των ελαστικών ιδιοτήτων του κολλαγόνου και της μειωμένης προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων στην υαλουρονάνη, τα κύτταρα αποσπώνται ευκολότερα από την κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον η υαλουρονάνη έχει συσχετιστεί με μείωση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και έχει προθρομβωτικές ιδιότητες (48).

Σημαντικό ρόλο στην διάβρωση της πλάκας παίζει η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων τα οποία συγκεντρώνονται στον απογυμνωμένο έσω χιτώνα, όπου νεκρώνονται και απελευθερώνουν ουδετερόφιλες εξωκυττάριας παγίδες (NETs) οι οποίες με τη σειρά τους διεγείρουν την πήξη τοπικά (49).

Οι θανατηφόρες διαβρώσεις απαντώνται συχνότερα σε γυναίκες, στην υπερτριγλυκεριδαμία, στο σακχαρώδη διαβήτη και σε μεγάλη ηλικία (50).

Θρόμβωση

Η θρομβωτική απάντηση στην ρήξη ή στην διάβρωση ποικίλει, ενώ σχετικά σπάνια προκαλεί αποφρακτικό θρόμβο. Κύριοι παράγοντες αποτελούν την τριάδα του Virchow και είναι: η θρομβογεννητικότητα της εκτιθέμενης πλάκας, οι διαταραχές στην τοπική ροή αίματος - στάση και η διαταραχή της πηκτικότητας του αίματος. Με την ρήξη της πλάκας το κολλαγόνο και ο λιπιδικός πυρήνας που είναι ιδιαίτερα θρομβογόνα εκτίθενται στους θρομβογόνους παράγοντες του αίματος. Στην διάβρωση της πλάκας δεν υπάρχει η ίδια έκθεση θρομβογόνου υλικού και επομένως

άλλοι παράγοντες τις τριάδας του Virchow παίζουν κυρίαρχο ρόλο. Όπως προαναφέρθηκε η ανταπόκριση ως προς την θρόμβωση ποικίλει, καθώς μπορεί να είναι είτε άμεση όπως συμβαίνει στην ρήξη πλάκας όπου υλικό της πλάκας αναμιγνύεται με τον θρόμβο, είτε δυναμική όπου η θρόμβωση και η θρομβόλυση που συνήθως σχετίζονται με αγγειοσπασμό, συμβαίνουν ταυτόχρονα με αποτέλεσμα μια διακοπτόμενη ροή και τον σχηματισμό στοιβάδων θρόμβου σε διάστημα ημερών.

Οι επιφανειακές διαβρώσεις των πλακών από μόνες τους δεν προκαλούν κριτικές αποφράξεις. Σε αυτές συμβάλλουν οι θρόμβοι που δημιουργούνται από τη δυσλειτουργία του έσω χιτώνα.

Στην κλινική πράξη λόγω της αναγκαιότητας χαρακτηρισμού και προσδιορισμού της επικινδυνότητας και του ρυθμού εξέλιξης της αθηροσκλήρυνσης χρησιμοποιήθηκαν οι όροι αθηρωματικό φορτίο και ευαλωτότητα της πλάκας.

Αθηρωματικό φορτίο

Το αθηρωματικό φορτίο αντανakλά την έκταση της αθηροσκλήρυνσης στον οργανισμό ή σε ένα συγκεκριμένο αγγειακό δίκτυο (vascular bed) άσχετα με την κυτταρική σύνθεση αυτού και την δραστηριότητα της πλάκας. Μπορεί να μετρηθεί με βάση το μέγεθος της πλάκας, την αρτηριακή επιφάνεια που καλύπτεται από πλάκες, με τον υπολογισμό του ποσοστού ασβεστίου των στεφανιαίων αρτηριών μέσω του αξονικού τομογράφου, με το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα και των πλακών των καρωτίδων με την χρήση υπερήχου και με τον σφηροβραχιόνιο δείκτη. Καθώς η αθηροσκλήρυνση είναι μια γενικευμένη αγγειακή νόσος το αυξημένο αθηρωματικό φορτίο σε ένα αγγειακό δίκτυο αποτελεί δείκτη προχωρημένης νόσου σε άλλο αγγειακό δίκτυο και επιπλέον συμβάλλει στην αξιολόγηση του καρδιαγγειακού κινδύνου.

Ευαλωτότητα πλάκας

Η αποσταθεροποίηση της πλάκας είναι ένα φαινόμενο το οποίο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως τα δομικά χαρακτηριστικά της πλάκας, η τάση που ασκείται στην πλάκα και από διάφορες βιολογικές διαδικασίες που καθορίζουν τις μηχανικές δυνάμεις. Ο όρος ευάλωτη πλάκα χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει με ιστολογικά κριτήρια την πλάκα που είναι πιθανόν να ραγεί και να προκαλέσει

θρόμβωση. Η ρήξη πλάκας, με την ρήξη της ινώδους κάψας και την έκθεση θρομβογόνου και προφλεγμονώδους νεκρωτικού πυρήνα στην αιματική κυκλοφορία, είναι η πιο κοινή μορφή αποσταθεροποίησης της πλάκας και ευθύνεται για το 70% των θανατηφόρων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου και του αιφνίδιου καρδιακού θανάτου (51). Η πλάκα που υφίσταται ρήξη κυρίως είναι το ινοαθήρωμα, με μεγάλο νεκρωτικό πυρήνα και έντονη διήθηση από μακροφάγα, πλάκες μεγάλες σε μέγεθος με επεκτατική αναδιαμόρφωση, νεοαγγειογένεση, ενδοπλακική αιμορραγία, φλεγμονή και αποτιτανώσεις. Ο ιστοπαθολογικός ορισμός της ευάλωτης πλάκας συμπεριλαμβάνει την λεπτή ινώδη κάψα (με πάχος <65μm) με λίγα λεία μυϊκά κύτταρα, διείσδυση φλεγμονωδών κυττάρων όπως λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, ενεργοποιημένα πρωτεολυτικά ένζυμα και μεγάλους λιπιδικούς/νεκρωτικούς πυρήνες οι οποίοι περιλαμβάνουν >40% του όγκου της βλάβης. Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα είναι γνωστό ότι αποτελούν κινητήριο δύναμη για την αποσταθεροποίηση της πλάκας. Οι ευάλωτες πλάκες είναι έντονα διηθημένες από μονοκύτταρα/μακροφάγα κυρίως στη περιοχή ανάκαμψης της λεπτής ινώδους κάψας. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα απελευθερώνουν προφλεγμονώδη μόρια όπως την ιντερλευκίνη-6 και τον παράγοντα νέκρωσης όγκου-α, τις προαθηροσκληρωτικές χυμοκίνες, τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, τα mi-RNAs και τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) (52). Επιπλέον οι επαναλαμβανόμενες υποκλινικές ρήξεις πλακών, που ιστολογικά και μακροσκοπικά χαρακτηρίζονται ως ενδοπλακική αιμορραγία, μπορεί να αποτελούν μια ακόμα αιτία ευαλωτότητας της πλάκας. Βέβαια μελέτες έδειξαν ότι η αναγνώριση των ευάλωτων πλακών πιθανώς έχει χαμηλή θετική προγνωστική αξία. Σε μια μεγάλη προοπτική μελέτη, στη μελέτη PROSPECT από τα 596 ινοαθηρώματα που είχαν αναγνωριστεί με IVUS σε ασθενείς υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου μόνο έξι επεισόδια εμφράγματος του μυοκαρδίου σημειώθηκαν σε διάρκεια 3 ετών (53).

Συμπερασματικά παρόλο την εξέλιξη των μέσων απεικόνισης και αξιολόγησης της πλάκας, καθώς και την αναγνώριση των μηχανισμών εξέλιξής της υπάρχει ένα μεγάλο πεδίο προς διερεύνηση ως προς την πυροδότηση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων.

3. Αγγειακή γήρανση

Η γήρανση θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, όχι μόνο για την αθροιστική δράση των μείζονων παραγόντων κινδύνου στο πέρασμα του χρόνου, αλλά και επειδή διαταράσσει την καρδιαγγειακή ομοιόσταση (54). Οι αρτηρίες υπόκεινται ποικίλες βιολογικές αλλαγές με την ηλικία, αλλά οι ακριβείς μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Η αγγειακή γήρανση ξεκινάει στα πρώιμα στάδια της ζωής και χαρακτηρίζεται από σταδιακή αλλαγή στην δομή και στη λειτουργία των αγγείων με αποτέλεσμα την μείωση της αρτηριακής ενδοτικότητας και την επιδείνωση της αρτηριακής σκληρίας (55). Η αύξηση της αρτηριακής σκληρίας θεωρείται ένας από τους πρώιμους δείκτες αγγειακής γήρανσης (56). Για την επιδείνωση της αρτηριακής σκληρίας παίζουν ρόλο πολύπλοκοι μηχανισμοί που επηρεάζουν τα λειτουργικά και δομικά στοιχεία του αγγειακού τοιχώματος οι περισσότεροι από τους οποίους είναι κοινοί στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης.

Η γήρανση αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την αθηροσκλήρυνση ακόμα και όταν όλοι οι κλασσικοί παράγοντες κινδύνου έχουν ελεγχθεί. Οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου φαίνεται να προωθούν την πρόιμη ή την επιταχυνόμενη αγγειακή γήρανση (57), ενώ η κυτταρική γήρανση έχει δείξει να σχετίζεται με την αθηροσκλήρυνση (58).

Με την πάροδο του χρόνου τα φυσιολογικά αγγεία οδηγούνται σε πάχυνση του έσω-μέσου χιτώνα (αγγειακή αναδιαμόρφωση), σταδιακή μείωση της ελαστικότητάς τους και σε αρτηριακή σκλήρυνση και όπως προαναφέρθηκε μοιράζονται ποικίλους παθολογικούς μηχανισμούς με την αθηροσκλήρυνση. Η αγγειακή γήρανση χαρακτηρίζεται από μείωση των λείων μυϊκών κυττάρων στο μέσω χιτώνα, αύξηση εναπόθεσης κολλαγόνου και αποδόμηση ελαστίνης και πιθανή διάταση ή αύξηση του αγγειακού αυλού. Στην αύξηση του κολλαγόνου και την μείωση της ελαστίνης συμβάλλουν η ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεασών, η αύξηση των γλυκοζιωμένων πρωτεϊνών, η αύξηση των προφλεγμονωδών κυττάρων και η αυξημένη πρόσληψη λιποπρωτεϊνών. Με την γήρανση υπάρχουν αλλαγές σε διάφορους τύπους κυττάρων όπως τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα φλεγμονώδη κύτταρα καθώς έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στον πολλαπλασιασμό τους, αύξηση της απόπτωσής τους, σημαντική βλάβη του DNA, εκτεταμένη βράχυνση των τελομερών,

καθώς και επιγενετικές αλλαγές, χαρακτηριστικά που ανευρίσκονται και στις αθηρωματικές πλάκες (59). Τόσο η αγγειακή γήρανση όσο και η αθηροσκλήρυνση σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση, η οποία βλάπτει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυξάνει τις ελεύθερες ρίζες και δημιουργεί μια προφλεγμονώδη κατάσταση, καθώς αυξάνει την έκκριση κυτοκινών και μορίων προσκόλλησης και επηρεάζει την σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Αυτά τα μονοπάτια της αγγειακής γήρανσης που οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αύξηση του οξειδωτικού στρες και αγγειακή φλεγμονή επιταχύνουν την αγγειακή γήρανση και τον υποκλινικό φαινότυπό της, την αρτηριακή σκληρία.

3.1 Αρτηριακή σκληρία

Η αρτηριακή σκληρία όπως προαναφέρθηκε είναι από τις πιο πρώιμα ανιχνεύσιμες δομικές και λειτουργικές αλλαγές του αγγειακού τοιχώματος. Η εκφυλιστική σκλήρυνση των αρτηριακών δικτύων χαρακτηρίζεται ως αρτηριοσκλήρυνση, όρος που διαχωρίζεται από την αθηροσκλήρυνση (60). Οι δύο έννοιες συχνά συνυπάρχουν ειδικά στους ηλικιωμένους με συνήθως δυσδιάκριτες διαφορές ανάμεσα στην αγγειακή γήρανση και στην αγγειακή νόσο (61). Σε φυσιολογικές τιμές αορτικής σκληρίας σε νέους ενήλικες, κατά τη διάρκεια της συστολής 40-50% του όγκου παλμού προωθείται στην περιφέρεια, ενώ το υπόλοιπο παραμένει στην διατεταμένη αορτή και στην συνέχεια διανέμεται κατά την διαστολή. Με αυτό τον μηχανισμό διατηρείται μια συνεχής αιμάτωση ανάμεσα στους καρδιακούς κύκλους. Με την κοιλιακή συστολή παράγεται ένα κύμα πίεσης που διανέμεται σε όλο το αγγειακό δέντρο με συγκεκριμένη ταχύτητα, το οποίο ονομάζεται ταχύτητα σφυγμικού κύματος (PWV) και το οποίο αυξάνεται με την αρτηριακή σκλήρυνση. Το αρχικό προσπίπτον κύμα που παράγεται από την αριστερή κοιλία κατά τη διάρκεια της συστολής ταξιδεύει προς την περιφέρεια μέσω μια διαδρομής χαμηλής αντίστασης διατηρώντας τη μέση πίεση σχεδόν αμετάβλητη και συναντά τα τελικά αρτηρίδια υψηλής αντίστασης όπου και ανακλάται. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ανακλάται το 80% του αρχικού κύματος. Το σφυγμικό κύμα είναι η συνισταμένη δύο κυμάτων, αυτού που οδεύει προς τις περιφερικές αντιστάσεις (διατρέχον) και αυτού που επιστρέφει (ανακλώμενο). Με την ηλικία το ελαστικό αρτηριακό δίκτυο και ειδικά η αορτή χάνει την ελαστικότητα της και την ικανότητα της να ρυθμίζει την καρδιακή

σφυγμική παροχή. Αυτές οι αλλαγές αυξάνουν την ταχύτητα σφυγμικού κύματος, βραχύνοντας την διάρκεια των ανακλώμενων κυμάτων καθώς επιστρέφουν ταχύτερα στην ρίζα της αορτής κατά την συστολή με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συστολική πίεση. Συνεπώς η πίεση παλμού και το μεταφόρτιο αυξάνονται ενώ διαταράσσεται η φυσιολογική στεφανιαία ροή (62). Αυτές οι αλλαγές μπορούν περαιτέρω να οδηγήσουν σε υπερτροφία της καρδιάς, στεφανιαία ισχαιμία και σε αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου (63,64).

Η ταχύτητα σφυγμικού κύματος (PWV) θεωρείται ο "χρυσός κανόνας" για την μη επεμβατική εκτίμηση της αρτηριακής σκληρίας (65). Η καρωτιδομηριαία PWV συνυπολογίζεται από τον χρόνο διέλευσης του παλμού και την απόσταση μεταξύ της κοινής καρωτίδας και της κοινής μηριαίας αρτηρίας (66). Η αορτική σκληρία μπορεί να υπολογιστεί και έμμεσα με τη χρήση τονομετρίας και τον προσδιορισμό του δείκτη επαύξησης αρτηριακής πίεσεως (Augmentation Index, AIx) και της κεντρικής πίεσης παλμού (67). Τόσο η ταχύτητα σφυγμικού κύματος, όσο και ο δείκτης επαύξησης της αρτηριακής πίεσης, θεωρούνται αξιόπιστες μη επεμβατικές μετρήσεις της αρτηριακής σκληρίας και σχετίζονται με τα καρδιαγγειακά συμβάντα και την αυξημένη θνητότητα (68,69).

3.2 Αγγειακή γήρανση και αρτηριακή σκλήρυνση - Μηχανισμοί

Υπάρχουν πολλαπλοί μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αγγειακή γήρανση και έχουν συσχετιστεί με την αρτηριακή σκληρία.

Οι απο-ακετυλάσες της ιστόνης (HDACs) τάξης 3, γνωστές ως σιρτουίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην γήρανση καθώς ρυθμίζουν μεγάλο εύρος βιολογικών διαδικασιών όπως την επιδιόρθωση του DNA, την αντιφλεγμονώδη απάντηση, την απάντηση στο οξειδωτικό στρες, τον μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης, την μιτοχονδριακή βιογένεση και την αυτοφαγία (70). Η σιρτουίνη 1 (SIRT 1) είναι η πιο μελετημένη σιρτουίνη όσον αφορά την γήρανση. Αρκετές πειραματικές μελέτες έχουν καθιερώσει την SIRT1 ως κύριο ρυθμιστή που δρα προστατευτικά έναντι στην επιταχυνόμενη αγγειακή γήρανση και αθηροσκλήρυνση (71-77). Η SIRT 1 δρα ενάντια στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, την αγγειακή φλεγμονή και την αρτηριακή σκληρία καθώς δρα προστατευτικά έναντι του σχηματισμού ενδοθηλιακής υπερπλασίας και της αγγειακής αναδιαμόρφωσης. Γενετικοί πολυμορφισμοί της

σιρτουίνης 1 (SIRT 1) έχουν συσχετιστεί με αλλαγές του πάχους του έσω μέσου χιτώνα στις καρωτίδες στους ανθρώπους (78). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και σε SIRT1 δια γονιδιακούς μύες, όπου η έκφραση της SIRT1 ήταν μειωμένη στον σχηματισμό του νέου έσω χιτώνα, ενώ η υπερέκφραση της SIRT 1 στα λεία μυϊκά κύτταρα ανέστειλαν τον σχηματισμό του νέου έσω χιτώνα (79). Εκτός από τον προστατευτικό ρόλο της SIRT 1 ως προς την ενδοθηλιακή λειτουργία, μελέτες έχουν δείξει τον ρόλο της στην αθηρογένεση και στην αθηροσκλήρυνση. Η SIRT 1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικών και ανθρώπων καταστέλλει τον μεταγραφικό παράγοντα NFκB και τα εξαρτώμενα από αυτόν προφλεγμονώδη μονοπάτια, προλαμβάνοντας έτσι μονοπάτια αθηρογένεσης και αγγειακής δυσλειτουργίας (75). Επιπλέον η SIRT 1 φαίνεται να ρυθμίζει την αθηροσκλήρυνση καθώς παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του mRNA της SIRT 1 σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος που απομονώθηκαν από ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο και από ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό (77).

Τα τελομερή είναι σύμπλοκα πρωτεϊνών που σταθεροποιούν τα τελευταία άκρα των ευκαριωτικών χρωμοσωμάτων και είναι υπεύθυνα για την ακεραιότητα του DNA. Το τελομερές αποτελείται από μια επαναλαμβανόμενη ακολουθία DNA(TTAGGG), η οποία επεκτείνεται σε μήκος μερικών χιλιάδων ζευγών νουκλεοτιδίων και καταλήγει στο μονόκλωνο 3' άκρο το οποίο χρησιμοποιείται για την πρόσδεση του ενζύμου της τελομεράσης (80). Σε κάθε αντιγραφή του DNA τα τελομερή βραχύνονται καθώς χάνουν 50-200 ζεύγη νουκλεοτιδίων. Μετά από περιορισμένο αριθμό κύκλων αντιγραφής του DNA , τα τελομερή συρρικνώνονται σε ένα ελάχιστο μήκος και στην συνέχεια επέρχεται η αναπαραγωγική γήρανση (replicative senescence). και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σταματά (81). Η τελομεράση ανταγωνίζεται την διαδικασία βράχυνσης των τελομερών και συμβάλλει στην αποκατάσταση και στη διατήρηση του μήκους των τελομερών (80). Η γήρανση με το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή που την χαρακτηρίζουν, αποτελεί την κύρια αιτία βράχυνσης των τελομερών (80). Βράχυνση των τελομερών σε άτομα άνω των 60 έχει συσχετιστεί με αυξημένη θνητότητα λόγω νοσημάτων που σχετίζονται με την γήρανση, καθώς σε ομάδα ασθενών με καρδιακή νόσο παρατηρήθηκε 3 φορές μεγαλύτερη θνητότητα σε αυτούς που έφεραν βραχύτερο τελομερές (82) . Μελέτες in vitro και in vivo έχουν

δείξει μια αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση του μήκους των τελομερών στα αγγεία με την ηλικία των αορτικών ενδοθηλιακών κυττάρων (83), τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για να καθορίσουν τον ρόλο που παίζει η βράχυνση των τελομερών στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Σε μελέτες σε ανθρώπους και σε πειραματικά μοντέλα παρατηρήθηκε συσχέτιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης και του μήκους των τελομερών τόσο σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος όσο και CD4-T κύτταρα (84). Σε περιοχές ευάλωτες για ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης, τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα συνέβαλλαν σε πιο εκτεταμένη βράχυνση των τελομερών (85). Επιπλέον σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο παρατηρήθηκε μια πιο επιταχυνόμενη βράχυνση των τελομερών στον υποπληθυσμό των λευκοκυττάρων (86). Συμπερασματικά φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης, της αθηροσκλήρυνσης και της βράχυνσης των τελομερών. Αυτό υποστηρίζεται και από μια μετα-ανάλυση όπου το μήκος των τελομερών των λευκοκυττάρων συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, ανεξάρτητα από του παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο (87).

Η προγερίνη είναι μια ανώμαλη ισομορφή της πρωτεΐνης λαμίνης A, που εμπλέκεται στο σύνδρομο Hutchinson- Gilford ή προγηρία. Η προγηρία είναι ένα σπάνιο σύνδρομο το οποίο προσβάλλει το δέρμα, το μυοσκελετικό σύστημα και τα αγγεία από εκδηλώσεις πρόωρου γήρατος, και αποτελεί ένα φυσικό πειραματικό μοντέλο για να μελετηθούν οι επιδράσεις της γήρανσης στον άνθρωπο. Σε διαγονιδιακούς μύες που έφεραν μετάλλαξη του ανθρώπινου γονιδίου της λαμίνης A (LMNA) σε *in vitro* μελέτη σε ιστούς στεφανιαίων αγγείων και της αορτής βρέθηκαν στοιχεία σχετιζόμενα με αρτηριακή σκλήρυνση όπως απώλεια λείων μυϊκών κυττάρων, αύξηση κολλαγόνου, μείωση της ελαστίνης και πάχυνση του έξω χιτώνα (88). Παρόμοια ευρήματα βρέθηκαν μετά από βιοψία σε στεφανιαίες αρτηρίες παιδιών με HGPS που απεβίωσαν από έμφραγμα του μυοκαρδίου (89).

Μελέτες υποστηρίζουν την συσχέτιση του γονιδίου Klotho και της αρτηριακής σκλήρυνσης. Η Klotho είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται κυρίως στο νεφρικό άπω εσπειραμένο σωληνάριο και σε μικρότερη έκταση στους ιστούς των αγγείων. Το γονίδιο της Klotho αρχικά εντοπίστηκε σαν μεταλλαγμένο γονίδιο σε μν Klotho (-/-) το οποίο παρουσιάζει μια εξαιρετικά μειωμένη διάρκεια

ζωής με πολλαπλές διαταραχές, οι οποίες οδηγούν σε πρόωρη πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια, μια κατάσταση παρόμοια με τα ανθρώπινα σύνδρομα της πρόωρης γήρανσης, όπως αθηροσκλήρυνση, οστεοπενία και στειρότητα (90). Πειράματα in vivo σε μύες με έλλειψη του γονιδίου klotho (KL+/-) έδειξαν ότι η έλλειψη γονιδίου συσχετίστηκε με την αρτηριακή σκλήρυνση, με αυξημένες τιμές της PWV και της αρτηριακής πίεσης (91). Επιπλέον στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της SIRT1 υποστηρίζοντας πιθανή συσχέτιση της SIRT1 και του γονιδίου Klotho.

Συσχέτιση αρτηριακής σκληρίας με μηχανισμούς αγγειακής γήρανσης.

Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την προοδευτική αύξηση της PWV με την αύξηση της ηλικίας (92-96). Σε 146 υγιή άτομα χωρίς γνωστή καρδιαγγειακή νόσο ηλικίας 20 έως 91 ετών, παρατηρήθηκε αύξηση κατά πέντε φορές του καρωτιδικού δείκτη επαύξησης της πίεσης και κατά δύο φορές της ταχύτητας σφυγμικού κύματος της αορτής σε συνάρτηση με την αύξηση της ηλικίας (97). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται σε μελέτη που συμπεριέλαβε 420 άτομα Κινέζικου πληθυσμού, όπου παρατηρήθηκε αύξηση του PWV με την αύξηση της ηλικίας (93). Μεγάλη προοπτική μελέτη (Baltimore Longitudinal Study of Aging) που συμπεριέλαβε 775 άτομα μετά από επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της PWV παρατήρησε αύξηση της PWV με την ηλικία και στα δύο φύλα, ενώ απότομη αύξηση παρατηρήθηκε στους άνδρες άνω των 50 ετών (98).

Μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει συσχέτιση της αρτηριακής σκλήρυνσης με το μήκος των τελομερών. Σε νέο πληθυσμό το μήκος του τελομερούς παρατηρήθηκε σημαντικά πιο βραχύ σε αυτούς με υψηλή PWV σε σχέση με αυτούς που είχαν χαμηλή PWV ενώ σε ηλικιωμένο πληθυσμό το μήκος του τελομερούς ήταν πιο μακρύ σε αυτούς με υψηλή PWV, υποδεικνύοντας έτσι μια διαφορετική σχέση του μήκους του τελομερούς και της PWV στην προχωρημένη ηλικία (99). Σε 193 άτομα που αξιολογήθηκε η πίεση παλμού, η PWV και το μήκος του τελομερούς σε λευκοκύτταρα βρέθηκε ότι το μήκος του τελομερούς μειώθηκε με την αύξηση της ηλικίας και στα δύο φύλα, ενώ στους άνδρες με πιο βραχύ τελομερές παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης της πίεσης παλμού και της PWV (100). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν ασθενείς με στεφανιαία νόσο, όπου παρατηρήθηκε συσχέτιση της

βράχυνσης του τελομερούς με την αύξηση της αρτηριακής σκληρίας και την καρδιαγγειακή νόσο (101).

Ασθενείς με HGPS αναπτύσσουν κλινικά χαρακτηριστικά επιταχυνόμενης αγγειακής γήρανσης. Σε 15 παιδιά με HGPS παρατηρήθηκε μειωμένη αρτηριακή ενδοτικότητα, αυξημένη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, αυξημένα αρτηριακά ανακλώμενα κύματα, ενδείξεις αυξημένου μεταφορτίου, αγγειακής αντίστασης και αορτικής σκλήρυνσης. Ο σφυροβραχιόνιος δείκτης βρέθηκε επίσης μη φυσιολογικός, χαρακτηριστικό περιφερικής αγγειακής νόσου και η πλειοψηφία των παιδιών παρουσίαζαν πάχυνση του έσω-μέσου χιτώνα από την μέτρηση του πάχους του έσω-μέσου χιτώνα με υπερηχογράφημα καρωτίδων (102). Η προγερίνη βρέθηκε να αυξάνεται με την ηλικία στις στεφανιαίες αρτηρίες ασθενών χωρίς HGPS και βρέθηκε αρχικά να προσβάλλει τον εξωτερικό χιτώνα των στεφανιαίων αρτηριών και στη συνέχεια να επηρεάζει τον μέσο χιτώνα και τέλος να συμμετέχει στον σχηματισμό αθηρωματικών πλακών (103).

Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι αλλαγές των επιπέδων του β- αμυλοειδούς πεπτιδίου Αβ40 τόσο των κυκλοφορούντων επιπέδων όσο και του εγκεφάλου σχετίζονται με την αρτηριακή σκλήρυνση και την εξέλιξή της. Σε 107 υγιή άτομα η επιταχυνόμενη αύξηση των επιπέδων του κυκλοφορούντος Αβ40 σχετίστηκε με την εξέλιξη της αρτηριακής σκλήρυνσης σε διάστημα 5 ετών, γεγονός που επιβεβαιώνει την συμμετοχή του πεπτιδίου στην αγγειακή γήρανση (66).

3.3 Εκτίμηση αρτηριακής σκληρίας

Οι μέθοδοι εκτίμησης της αρτηριακής σκληρίας προσπαθούν να καθορίσουν τη σχέση μεταβολής διατοιχωματικής πίεσης και μεταβολής όγκου ή διαμέτρου της υπό μελέτη αρτηρίας ($\Delta V/\Delta P$ ή $\Delta D/\Delta P$), με την ανομοιογένεια της συμπεριφοράς των διαφόρων τμημάτων του αρτηριακού δικτύου, να είναι το κύριο πρόβλημα στην μεθοδολογία . Για το λόγο αυτό έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία πειραματικών μεθόδων (104,105):

α) Πίεση παλμού

Μια αδρή εκτίμηση της σκληρίας των μεγάλων αρτηριών λαμβάνουμε από τη διαφορά πίεσης μεταξύ συστολής και διαστολής (106). Η πίεση παλμού επηρεάζεται από πολλούς φυσιολογικούς παράγοντες, ενώ και η αύξηση του συστολικού ενδοαγγειακού όγκου καθορίζεται από τον όγκο παλμού και τη συστολική απορροή του σφυγμικού κύματος. Όμως σε παθολογικές καταστάσεις όπου επηρεάζεται ο όγκος παλμού, η μέθοδος δεν είναι αξιόπιστη. Επιπλέον, πιθανή μείωση της αρτηριακής πίεσης μειώνει την πίεση παλμού χωρίς αυτό να συνοδεύεται από αλλαγές στο αρτηριακό τοίχωμα.

β) Ταχύτητα σφυγμικού κύματος (PWV)

Τα χαρακτηριστικά του τοιχώματος των αρτηριών αγωγών καθορίζουν την ταχύτητα του σφυγμικού κύματος. Σύμφωνα με την εξίσωση Moens-Korteweg ($PWV = \sqrt{Eh/2\rho R}$), όπου E είναι ο συντελεστής Young's για το αρτηριακό τοίχωμα, το h πάχος τοιχώματος, το R η τελοδιαστολική αγγειακή διάμετρος και ρ η γλοιότητα του αίματος) η ταχύτητα σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τη διάμετρο και την ελαστικότητα των αγγείων (104).

Ωστόσο, σε καταστάσεις όπως η γήρανση (107) ή οι αθηρωματικές αλλοιώσεις που συνήθως συνοδεύονται από αναδιαμόρφωση του διαμετρήματος της αρτηρίας, παρατηρούμε αντιστάθμιση της αύξησης του PWV από την επιβράδυνση λόγω της αύξησης του ενδοαγγειακού όγκου. Εκτός της ηλικίας και της αθηρωματικών βλαβών η μέτρηση της PWV μπορεί να επηρεαστεί και από τα σημεία μέτρησης καθώς μπορεί να υπάρχουν διαφορές ως προς την τοιχωματική αναδιαμόρφωση και την διάμετρο του αγγείων μεταξύ των άνω και κάτω άκρων. Λόγω της η έλλειψης γραμμικότητας της σχέσης πίεσης / όγκου φαίνεται να υπάρχει άμεση συσχέτιση της αρτηριακής πίεσης με την αρτηριακή σκληρία, και επομένως μείωση της αρτηριακής πίεσης θα επιφέρει επιβράδυνση της ταχύτητας του σφυγμικού κύματος χωρίς αντίστοιχες αλλαγές στη δομή του αγγειακού τοιχώματος. Η ταχύτητα σφυγμικού κύματος προσδιορίζεται με χρήση δύο αισθητήρων Doppler -κεντρικού και περιφερικού- που τοποθετούνται απευθείας στο ύψος των επιφανειακών αρτηριών και υπολογίζουν το χρόνο που απαιτείται για να διέλθει το κύμα. Έτσι γίνεται να

εκτιμηθούν κεντρικότερες ταχύτητες σφυγμικού κύματος, αλλά και περιφερικότερες (106,108).

γ) Ανάλυση σφυγμικού κύματος

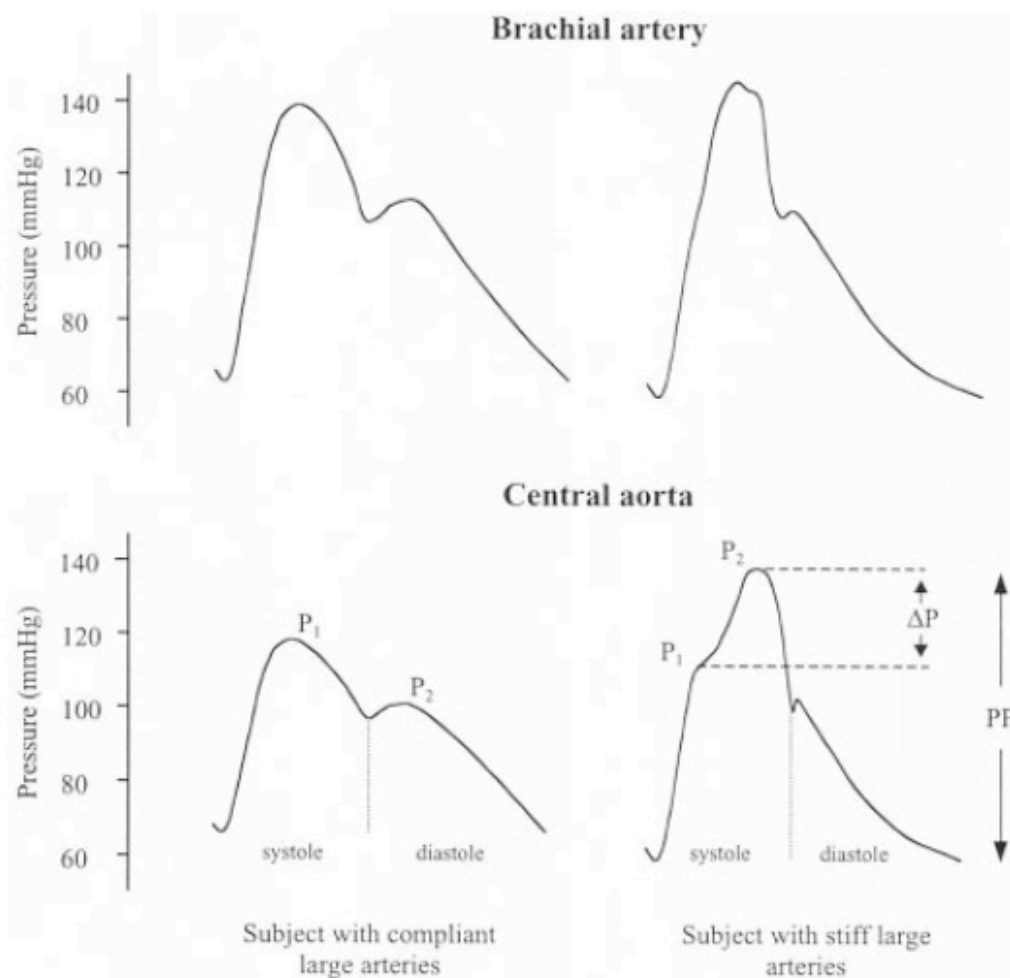
Η μορφολογία του σφυγμικού κύματος επηρεάζεται από τη δομή και τη λειτουργία των μεγάλων και των μικρών αρτηριών. Το σχήμα του σφυγμικού κύματος (**Σχήμα 2**) αλλάζει σημαντικά καθώς το παλμικό κύμα ταξιδεύει από την αορτή μέχρι τα περιφερικά αρτηριόλια. Επίσης η μέγιστη συστολική πίεση σταδιακά αυξάνεται, και εμφανίζεται ένα δίκροτο έπαρμα, ενώ και η ένταση της διαστολικής μείωσης της πίεσης μεταβάλλεται. Επομένως τα χαρακτηριστικά του σφυγμικού κύματος εξαρτώνται από τον όγκο παλμού, τα ανακλώμενα κύματα των διακλαδώσεων του αρτηριακού δικτύου, τη μικροκυκλοφορία, το ιξώδες του αίματος, τις ινοελαστικές ιδιότητες και τον αγγειακό τόνο πολλαπλών τμημάτων (109).

Για το δίκροτο έπαρμα της διαστολής ευθύνονται κυρίως τα ανακλώμενα κύματα που δημιουργούνται σε απώτερες θέσεις του αγγειακού συστήματος στην προηγούμενη εξώθηση και αναλόγως της χρονικής στιγμής επιστροφής τους και της άθροισής τους επηρεάζεται η επαύξηση της πίεσης στο τέλος της συστολής. Επομένως η αύξηση της κεντρικής πίεσης που παρατηρείται στα τέλη της συστολής αποδίδεται τόσο στη γήρανση όσο και στην αγγειακή νόσο, πιθανώς ως συνέπεια της αναδιαμόρφωσης του αρτηριακού τοιχώματος στο επίπεδο της ανακλώσας τοποθεσίας, η οποία προκαλεί αυξημένη ταχύτητα κύματος και ταχύτερη επιστροφή στη ρίζα της αορτής (104,109).

Η επαύξηση της συστολικής πίεσης στο επίπεδο κεντρικών πιέσεων προσδιορίζεται με την καταγραφή της περιφερικής αρτηριακής πίεσης και την χρήση μαθηματικών συναρτήσεων μεταφοράς (μετασχηματισμοί Fourier) (110,111). Ο δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσεως (Aix) θεωρείται υποκατάστατος δείκτης αρτηριακής σκληρίας (104), καθώς ο χρόνος επιστροφής των ανακλώμενων κυμάτων καθορίζεται από την αρτηριακή σκληρία ενώ επηρεάζεται και από επιπρόσθετους ανεξάρτητους παράγοντες όπως τα αγγειοδιασταλτικά φάρμακα και τη χρήση καπνού (112).

Μία διαφορετική προσέγγιση στην ανάλυση σφυγμικού κύματος θεωρεί το αγγειακό σύστημα ένα κλειστό σύστημα που μετατρέπει υδραυλικά την παλμικότητα της

κοιλιακής εξώθησης σε σταθερή ροή αίματος μέσω των ελαστικών ιδιοτήτων των αρτηριών που λειτουργούν ως ρεζερβουάρ (106). Στη διάρκεια της διαστολής δεν παρατηρείται ένα μεμονωμένο σφυγμικό κύμα αλλά ταλαντούμενα ημιτονοειδή και συνεχώς μειούμενα κύματα ανάκλασης από περιφερικές θέσεις. Σύμφωνα με αυτό, από τη στιγμή που κλείνει η αορτική βαλβίδα, η μορφολογία του διαστολικού σφυγμικού κύματος εξαρτάται αποκλειστικά από την αντίσταση, την ενδοτικότητα και την εμπέδηση λόγω αδράνειας του αγγειακού δικτύου και περιγράφονται από το μοντέλο Windkessel (113). Δεδομένου ότι η σκληρία των μεγάλων αρτηριών συναρτάται άμεσα από την αρτηριακή πίεση, ενώ η τελευταία επηρεάζεται αποκλειστικά από δομικές αλλαγές του τοιχώματος και της λειτουργίας των μικρών αγγείων, η μεθοδολογία επιτρέπει με κατάλληλο λογισμικό την εκτίμηση της σκληρίας του περιφερικού αγγειακού συστήματος από τη μελέτη της διαστολικής μορφολογίας του σφυγμικού κύματος (114,115,116).



Σχήμα 2. Συνοπτική αναπαράσταση της επαύξησης της πίεσης παλμού. Στην αριστερή πλευρά του σχήματος απεικονίζεται η φυσιολογική επαύξηση της αρτηριακής κυματομορφής, καθώς κινούμαστε περιφερικότερα στα πλαίσια υγιούς αγγειακού δικτύου. Σε αυξημένη αρτηριακή σκληρία πχ λόγω ηλικίας ή διαβήτη η επαύξηση μειώνεται όπως φαίνεται στα δεξιά. Στα δύο παραδείγματα η περιφερική πίεση είναι παρόμοια αλλά οι κεντρικές πιέσεις αποκλίνουν σημαντικά. Επιπρόσθετα, όταν η αρτηριακή ευενδοτότητα είναι φυσιολογική (κάτω αριστερό σχήμα) το αρχικό σφυγμικό κύμα(P₁) που ταξιδεύει προς τη περιφέρεια δημιουργεί ουσιαστικά τη μέγιστη συστολική αρτηριακή πίεση και τα ανακλώμενα κύματα(P₂) επιπροστίθεται στη διαστολή και αυξάνουν τη διαστολική πίεση και τη στεφανιαία ροή. Στην αντίθετη περίπτωση (κάτω δεξιά σχήμα), το κύμα P₂ επιστρέφει νωρίτερα και αυξάνει τη συστολική πίεση μειώνοντας παράλληλα τη διαστολική. Ο δείκτης επαύξησης της αρτηριακής πίεσεως υπολογίζεται ως το ποσοστό της διαφορά μεταξύ

μέγιστου P2 και P1 επί της πίεσης παλμού. Προσαρμοσμένο από: James J. Oliver, David J. Webb Noninvasive Assessment of Arterial Stiffness and Risk of Atherosclerotic Events *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:554-566.

4. ΚΑΘΕΨΙΝΕΣ

4.1 Γενικά

Οι πρωτεάσες ή αλλιώς πρωτεολυτικά ένζυμα είναι μια μεγάλη ομάδα ενζύμων απαραίτητα για τον καταβολισμό των πεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών και τον σχηματισμό αμινοξέων σε αρχέγονους οργανισμούς. Οι πρωτεάσες διασπών πρωτεΐνες είτε από τα N και C άκρα ως αμινοπεπτιδάσες και καρβοξυπεπτιδάσες αντίστοιχα , είτε από το μέσο του μορίου ως ενδοπεπτιδάσες (117). Επιπλέον κατά την αποδόμηση των πρωτεϊνών σχηματίζεται ένας πρωτεολυτικός καταρράκτης όπου η πληροφορία διαδίδεται μέσω ενός μονοπατιού που κύριο ρόλο παίζει η συνεχιζόμενη ενεργοποίηση των ζυμογόνων πρωτεασών. Επομένως οι πρωτεάσες διασπώντας πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην δραστηριότητα των πρωτεϊνών , την αλληλεπίδραση μεταξύ τους , στη δημιουργία νέων μοριακών βιοδεικτών , στην κυτταρική πληροφόρηση και στην δημιουργία και μετάδοση μοριακών σημάτων. Από αυτή την πολυπαραγοντική δράση, συμπεραίνεται η επιρροή των πρωτεασών σε μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού όπως την αντιγραφή και την μετάφραση του DNA, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση, την ιστική αναδιαμόρφωση, την αγγειογένεση, την νευρογένεση, την γονιμοποίηση, την κινητοποίηση των αρχέγονων κυττάρων, την αιμόσταση και την πήξη, την φλεγμονή, την ανοσία, την αυτοφαγία, την νέκρωση και την απόπτωση (118). Επομένως αλλαγές στο πρωτεολυτικό σύστημα θα μπορούσαν να αποτελέσουν αιτίες παθολογικών νοσημάτων όπως καρκίνος, νευροεκφυλιστικά και καρδιαγγειακά νοσήματα, και για αυτό πολλές πρωτεάσες σήμερα αποτελούν αντικείμενο έρευνας ως πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι ή ως προγνωστικοί δείκτες (118).

Οι ανθρώπινες πρωτεάσες διακρίνονται σε πέντε μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το αμινοξύ που υπάρχει στο ενεργό κέντρο κάθε κατηγορίας : τις πρωτεάσες κυστεΐνης , τις ασπαρτικές πρωτεάσες, τις πρωτεάσες σερίνης (ενεργοποιητής πλασμινογόνου, πλασμίνη, καλλικρεΐνη , ελαστάση των λευκοκυττάρων , καθεψίνη G, τρυψίνη, χυμοτριψίνη), τις μεταλλοπρωτεάσες (των οποίων το ενεργό κέντρο περικλείει ένα μόριο ψευδάργυρου και σπανιότερα χαλκού), και τις πρωτεάσες θρεονίνης. Οι πρωτεάσες των διαφορετικών κατηγοριών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω

σε οικογένειες ανάλογα με την ακολουθία του αμινοξέος και οι οικογένειες μπορούν και διαφοροποιηθούν σε ομάδες ανάλογα με την ομοιότητα τους ως προς την τρισδιάστατη δομή τους (119).

4.2 Εντοπισμός και ιδιότητες

Οι καθεψίνες είναι ένζυμα πρωτεασών και ως τώρα έχουν ανακαλυφθεί 15 ομάδες καθεψινών στους ανθρώπους (A,B,C,D,E,F,G,H,K,L,O,S,V,W,Z) (Πίνακας 2). Όπως προαναφέρθηκε κατηγοριοποιούνται σε τρεις κατηγορίες βασιζόμενες στο αμινοξύ που υπάρχει στο ενεργό κέντρο κάθε κατηγορίας : στις καθεψίνες D και E που αποτελούν τις ασπαρτικές καθεψίνες, τις καθεψίνες A και G που αποτελούν τις σερινοπρωτεάσες και τέλος στην μεγαλύτερη κατηγορία που είναι οι κυστείνο - πρωτεάσες και συμπεριλαμβάνει τις καθεψίνες B,C,F,H,K,L,O,S,V,W,Z/X (120). Αυτά τα ένζυμα είναι ενεργά σε χαμηλό PH στα λυσοσώματα και είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική διαδικασία της πέψης, της πήξης, της ανοσίας, της επαναρρόφησης οστού, της απόπτωσης, της αυτοφαγίας, της αγγειογένεσης, του πολλαπλασιασμού και της μετάστασης (121). Η αυτοφαγία είναι μια προστατευτική λειτουργία στα λυσοσώματα μέσω αποδόμησης των "ελαττωματικών" πρωτεϊνών (122). Από αυτή την πολλαπλή λειτουργία των καθεψινών συμπεραίνεται μια σειρά παθολογικών καταστάσεων που μπορεί να επιφέρει η δυσλειτουργία των καθεψινών όπως αρθρίτιδα, περιοδοντίτιδα, παγκρεατίτιδα, μυϊκή δυστροφία, αρτηριοσκλήρυνση, παχυσαρκία, εγκεφαλικό, Αλτσχάιμερ, σχιζοφρένια και φυματίωση.

Αρχικά οι καθεψίνες είχαν χαρακτηριστεί ως ενδοκυττάριας πεπτιδικές υδρολάσες αλλά αργότερα αποδείχτηκε ότι έχουν και εξωκυττάρια δραστηριότητα. Οι καθεψίνες εκφράζονται σε διάφορα κύτταρα στο σώμα όπως οι καθεψίνες B,L,H,C, ενώ νεότερες μελέτες έχουν ταυτοποιήσει εξειδικευμένες λειτουργίες για κάποια μέλη της οικογένειας καθεψινών όπως τις καθεψίνες K,W και X οι οποίες εκφράζονται από ειδικά κύτταρα και ιστούς όπως ερυθροκύτταρα, λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, πνεύμονες, σπλήνα και θύμο αδένες (123).

Όλες οι καθεψίνες συντίθενται ως αδρανείς πρόδρομοι (124). Οι πρόδρομες καθεψίνες υφίστανται πρωτεολυτική διεργασία και ωρίμανση μέσα στα λυσοσώματα αλλά η καθεμία επηρεάζεται από διαφορετικές τιμές PH οι οποίες καθορίζουν την

πρωτονίωση των αμινοξέων στο ενεργό κέντρο κάθε καθεψίνης. Το ουδέτερο PH μπορεί να ενισχύσει την δραστηριότητα της καθεψίνης ενώ το αλκαλικό PH να την απενεργοποιήσει. Η καθεψίνη Β είναι εξαρτώμενη από το PH καθώς το όξινο PH με τιμή 5.6 ευνοεί την δράση της (125).

Όπως αρχικά ήταν γνωστό οι καθεψίνες διασπούν τις πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες μέσα στα ενδο-λυσosώματα ενώ σε ουδέτερες συνθήκες PH απενεργοποιούνταν η δράση τους. Βέβαια τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί και η εξωκυττάρια πρωτεόλυση των καθεψινών υπό ουδέτερα και οξειδωτικά περιβάλλοντα (126). Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες και πιθανοί μηχανισμοί που δικαιολογούν την ενεργοποίηση των καθεψινών υπό αυτές τις συνθήκες στο εξωκυττάριο χώρο όπως : η έκκριση των καθεψινών ως ζυμογόνα τα καθιστά σταθερά έως την ενεργοποίησή τους και οι καθεψίνες μπορούν να εκκριθούν στην ενεργό μορφή τους και η συγκέντρωσή τους να είναι αρκετή για την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Ένας παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτό είναι ο τύπος του κυττάρου. Έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα καθεψινών να εκκρίνονται από κύτταρα ανοσίας και έτσι δικαιολογούνται τα υψηλά επίπεδα που παρατηρούνται στην φλεγμονή (127). Επίσης η έκκριση υψηλών επιπέδων καθεψινών μπορεί να οφείλεται σε εξωκυττάρια ερεθίσματα από κυτοκίνες και ιντερλευκίνες (128) αλλά και σε συνθήκες όξυνσης του εξωκυττάριας χώρου όπως αυτό παρατηρείται σε μικροπεριβάλλοντα όγκων (129) και στις αθηρωματικές πλάκες (130).

Επομένως οι εξωκυττάρια καθεψίνες συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) αποδομώντας τα δομικά στοιχεία που υπάρχουν σε περίσσεια. όπως η ελαστίνη και το κολλαγόνο. Η εξωκυττάρια ουσία που περικλείει τα κύτταρα συντίθεται από πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα. Τα κύρια στοιχεία της ECM είναι δομικές πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο, η ελαστίνη, η φμπρονεκτίνη και η λαμίνη, οι πολυσακχαρίτες όπως οι γλυκοαμινογλυκάνες και το υαλουρονικό και οι πρωτεογλυκάνες. Η δομή της ECM εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ σύνθεσης και αποδόμησης και άρα ένας σημαντικός μηχανισμός στην ρύθμιση της ECM είναι η πρωτεόλυση στην οποία καθοριστικό ρόλο έχουν οι πρωτεάσες όπως οι μεταλλοπρωτεάσες και οι κυστεϊνοπρωτεάσες (125). Οι κυστεϊνοπρωτεάσες μπορούν να μεταναστεύσουν στην κυτταρική επιφάνεια και να εκκριθούν στον εξωκυττάρια χώρο και να αποδομήσουν

συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (131). Επιπλέον στην κυτταρική μεμβράνη μπορούν να κατευθύνουν ένα πρωτεολυτικό καταρράκτη μέσω μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης κατά τον οποίο ενεργοποιούνται και άλλες πρωτεάσες (132)

Πίνακας 2. Ταξινόμηση καθεψινών (133)

Καθεψίνη	Τύπος πρωτεάσης	Ενδο/εξωπεπτιδάση	Έκφραση στους ιστούς	Λειτουργία
A	Σερίνης	Εξωπεπτιδάση	Αιμοπετάλια, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, κύτταρα των όσχεων και επιδιδυμίδας	Αυτοφαγία, ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, σχηματισμός ελαστικών ινών
B	Κυστεΐνης	Εξωπεπτιδάση και ενδοπεπτιδάση	Ευρέως κατανεμημένη στα μακροφάγα, ηπατοκύτταρα	Καταβολισμός πρωτεϊνών, επεξεργασία αντιγόνων, αναδιαμόρφωση οστών
C	Κυστεΐνης	Εξωπεπτιδάση	Ευρέως κατανεμημένη στους ιστούς, νεφρικά σωληνάκια, όλα τα ενδοκρινή όργανα	Υδρολύει εστέρες διπεπτιδία, αμίδια, ανιλίδια και βήτα-φθαμίνες
D	Ασπαρτική πρωτεάση	Ενδοπεπτιδάση	Ίδρωτοποιοί αδένες, μήτρα και στο αρθρικό υγρό του χόνδρου	Αποδομεί πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον των λυσοσωμάτων
E	Ασπαρτική πρωτεάση	Ενδοπεπτιδάση	Ανοσοποιητικό σύστημα	Παρουσίαση αντιγόνου
F	Κυστεΐνης	Ενδοπεπτιδάση	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα	Παρουσίαση αντιγόνου
G	Σερίνης	Ενδοπεπτιδάση	Πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα	Ανοσοσύμπλεγμα, παραγωγή αγγειοτενσίνης II, αποδόμηση της εξωκυττάριας

				ουσίας
H	Κυστεΐνης	Ενδοπεπτιδάση	Εκφράζεται παντού	Ασκεί δράση ενδοπεπτιδάσης
L	Κυστεΐνης	Ενδοπεπτιδάση	Εκφράζεται παντού	Διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, παρουσίαση αντιγόνου
K	Κυστεΐνης	Ενδοπεπτιδάση	Οστά, ωοθήκη, καρδιά, πλακούντα, πνεύμονα, σκελετικό μυ, παχύ και λεπτό έντερο	Οστική ανακατασκευή
O	Κυστεΐνης	Ενδοπεπτιδάση	Ευρέως κανανεμημένη στους ιστούς	Πρωτεϊνική αποδόμηση
S	Κυστεΐνης	Ενδοπεπτιδάση	Σπλήνα, αντιγονοπαρουσιατικά κύτταρα	Πρωτεόλυση
V	Κυστεΐνης	Ενδοπεπτιδάση	Θύμο, όρχεις, επιθήλιο του κερατοειδούς	Παραγωγή εγκεφαλίνης και νευροπετιδίου Y
W	Κυστεΐνης	Ενδοπεπτιδάση	T- λεμφοκύτταρα	Κυτταρομεσολαβιτική κυτταροτοξικότητα
Z	Κυστεΐνης	Εξωπεπτιδάση	Ευρέως κανανεμημένη στους ιστούς	Πρωτεϊνική αποδόμηση

4.3 Κυστεΐνοπρωτεάσες

Οι κυστεΐνοπρωτεάσες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεασών κυστεΐνης που ανήκει στην ομάδα της παπαΐνης λόγω της χαρακτηριστικής δομής τους με τους δύο λοβούς (L αριστερός λοβός και R δεξιός λοβός) και μια δραστική περιοχή που περιέχει κατάλοιπα κυστεΐνης και ιστιδίνης (Cys25-His159). Οι κυστεΐνοκαθεψίνες είναι μονομερή με μοριακό βάρος 20-35 kDa με εξαίρεση την τετραμερή καθεψίνη C με μοριακό βάρος 200 kDa. Οι περισσότερες κυστεΐνοπρωτεάσες είναι ενδοπεπτιδάσες όπως οι καθεψίνες F,K,L,S,V, ενώ οι καθεψίνες B και H έχουν διπλή δράση ως ενδοπεπτιδάση και ως εξωπεπτιδάση και οι καθεψίνες C και X/Z έχουν

δράση μόνο ως εξωπεπτιδάσες. Οι καθεψίνες όπως οι B,C,F,H,L,O και X εκφράζονται ευρέως στα ανθρώπινα κύτταρα και στους ιστούς ενώ οι καθεψίνες K,S,V και W έχουν πιο εξειδικευμένες λειτουργίες και εκφράζονται σε συγκεκριμένες τοποθεσίες. Η καθεψίνη K εκφράζεται στους οστεοκλάστες και στους ινοκλάστες, η καθεψίνη S εκφράζεται κυρίως στα κύτταρα ανοσίας, η καθεψίνη V στον θύμο αδένα και η καθεψίνη W στα λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα "φυσικούς φονείς". Η έκφραση των καθεψινών ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες SP1,ETS1 και EB(TFEB)(128). Όλες οι καθεψίνες συντίθενται αρχικά ως ανενεργά ζυμογόνα και μετα - μεταφραστικά τροποποιούνται από τημανόζη -6 φωσφατάση στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύστημα Golgi, ώστε να απομονωθούν και να διατεθούν στα λυσοσώματα (134). Η ενεργοποίηση των καθεψινών είναι μια περίπλοκη και πολυεπίπεδη διαδικασία που περιλαμβάνει την απομάκρυνση του ενεργού κέντρου από άλλες πρωτεάσες ή την αυτοκαταλυτική δράση τους σε όξινο περιβάλλον. Όπως προαναφέρθηκε οι καθεψίνες ενεργοποιούνται σε όξινο περιβάλλον με εξαίρεση την καθεψίνη S που παραμένει ενεργή και σε αλκαλικό pH. Παρά την προτίμηση των καθεψινών στο όξινο περιβάλλον των λυσοσωμάτων, έχουν βρεθεί να δραστηριοποιούνται και έξω από το λυσόσωμα συμμετέχοντας στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας, στη φλεγμονή, στον καρκίνο και στην αθηροσκλήρυνση.

Η εξωκυττάρια δράση των καθεψινών ενισχύεται από αρνητικά φορτισμένους πολυσακχαρίτες όπως είναι οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGS) οι οποίοι έχουν βρεθεί να σταθεροποιούν τις καθεψίνες B,L και S και να ευνοούν την δράση τους ακόμα και σε ουδέτερο pH (134). Επιπλέον η δράση των καθεψινών επηρεάζεται από την παρουσία των ενδογενών αναστολέων των καθεψινών, των συστατινών. Οι συστατίνες βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων (συστατίνες A και B) αλλά και εξωκυττάρια (συστατίνη C). Χαμηλά επίπεδα συστατίνης έχουν παρατηρηθεί σε φλεγμονώδη νοσήματα όπως η αθηροσκλήρυνση και τα κοιλιακά ανευρύσματα (136).

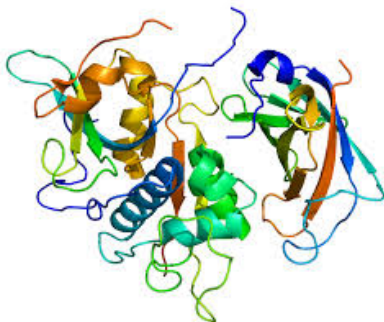
4.4 Κυστεϊνοκαθεψίνες και αθηροσκλήρυνση

Μελέτες σε ανθρώπινους ιστούς έδειξαν, όπως προαναφέρθηκε, αυξημένη έκφραση και δράση των καθεψινών σε φλεγμονώδεις παθήσεις, στην αθηροσκλήρυνση και στα κοιλιακά ανευρύσματα. Στην αθηροσκλήρυνση οι καθεψίνες υπερεκφράζονται

σχεδόν σε όλα τα κύτταρα από τα οποία αποτελείται μια αθηρωματική πλάκα και ιδιαίτερα στα μακροφάγα, στα λεία μυϊκά κύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (137). Προκλινικές μελέτες σε επίμυες με έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE) και υπό δίαιτα με υψηλά λιπαρά βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερη έκφραση των κυστεϊνοπρωτεασών στις αγγειακές βλάβες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (138). Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η έκφραση των καθεψινών στις πλάκες ενισχύεται από φλεγμονώδους μεσολαβητές όπως ιντερφερόνη - γ (IFN-γ), ιντερλευκίνη 1β (IL -1β) και τον παράγοντα νέκρωσης (TNF-α) ενώ πρόσφατη μελέτη σε ανθρώπους έδειξε ότι η φλεγμονώδης διεργασία μπορεί να επιφέρει μεταβολές στον μεταβολισμό και στην σταθεροποίηση του mRNA της καθεψίνης S καθώς ενισχύεται η μετάφραση του στις αθηρωματικές βλάβες (139). Ένας επιπλέον μηχανισμός που οι κυστεϊνοπρωτεάσες συνεισφέρουν στην δημιουργία αθηρωματικών πλακών είναι μέσω της επίδρασης που έχουν στην ομοιοστάση της χοληστερόλης καθώς η οξειδωμένη LDL (oxLDL) ενισχύει την λειτουργία των καθεψινών καθώς συμβάλλει στην παραμονή της χοληστερόλης στο λυσόσωμα και την μειωμένη έξοδο της HDL.

4.5 Ομάδες κυστεϊνοπρωτεασών

1. Καθεψίνη C

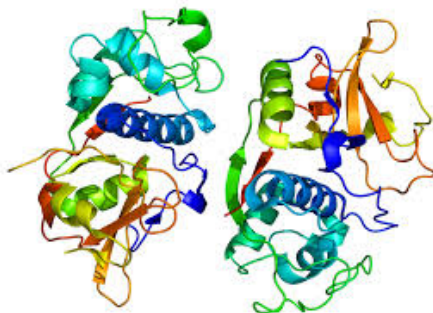


Εικόνα 3. Δομή καθεψίνης C

Η καθεψίνη C (**Εικ. 3**) ή αλλιώς η διπεπτιδυλική πεπτιδάση I (DPPI) είναι μια κυστεϊνοπρωτεάση που εκφράζεται σε πολλούς ιστούς στα θηλαστικά και στα ζώα. Στα θηλαστικά εκφράζεται κυρίως στον πνεύμονα, στον σπλήνα, στο νεφρό, στο ήπαρ και στα μυελοειδή κύτταρα. Η καθεψίνη C δρα ως εξωπεπτιδάση του N

τελικού άκρου στο όξινο περιβάλλον του λυσοσώματος (140). Σε αντίθεση με τις άλλες κυστεΐνοπρωτεάσες έχει τετραμερή δομή που εμποδίζει την αυτοενεργοποίηση της και για αυτό απαιτούνται άλλες πρωτεάσες για την ενέργεια αυτή, όπως η L και η S (141). Επιπλέον παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού καθώς ενεργοποιεί διάφορες πρωτεάσες σερίνης από κύτταρα φυσικούς φονείς και φλεγμονώδη κύτταρα (140). Η παθολογική έλλειψη της καθεψίνης C έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με περιοδοντίτιδα, με σύνδρομο Papillion Lefevre και με σύνδρομο HaimMonk (142).

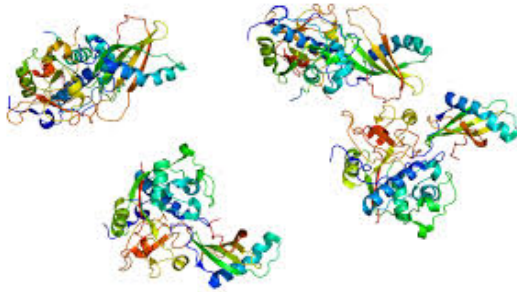
2. Καθεψίνη F



Εικόνα 4. Δομή καθεψίνης F

Η καθεψίνη F (**Εικ.4**) είναι μια λυσοσωμική κυστεΐνοπρωτεάση και το γονίδιο της εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 11 στη θέση 11q13. Η καθεψίνη F κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στην επεξεργασία της αμετάβλητης αλυσίδας στο μείζονα σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II. Δεδομένα δείχνουν ότι η αναστολή της δράσης της καθεψίνης C μπλοκάρει την επεξεργασία του MCH τάξης II στα μακροφάγα και συμπερασματικά οι αναστολείς αυτού του ενζύμου θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία νοσημάτων με αυξημένη ή ακατάλληλη ανοσοανταπόκριση όπως είναι το άσθμα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (143). Επιπλέον το γονίδιο της καθεψίνης F εμπλέκεται σε πολλούς τύπους καρκίνου (144).

3. Καθεψίνη Η



Εικόνα 5. Δομή καθεψίνης Η

Η καθεψίνη Η (**Εικ. 5**) είναι μια κυστεϊνοπρωτεάση που αρχικά συντίθεται ως προένζυμο με 335 αμινοξέα. Μοναδικό χαρακτηριστικό της καθεψίνης αποτελεί η δράση της ως ενδοπεπτιδάση αλλά κυρίως ως αμινοπεπτιδάση (145). Η καθεψίνη Η εκφράζεται παντού, ενώ ιδιαίτερα μεγάλη έκφραση έχει παρατηρηθεί στους νεφρούς. Αυξημένη έκφραση της καθεψίνης Η έχει συσχετιστεί με διάφορους καρκίνους όπως καρκίνος μαστού, παχέος εντέρου (146), προστάτη (147), μελάνωμα (148) και γλοίωμα (149).

4. Καθεψίνη Κ

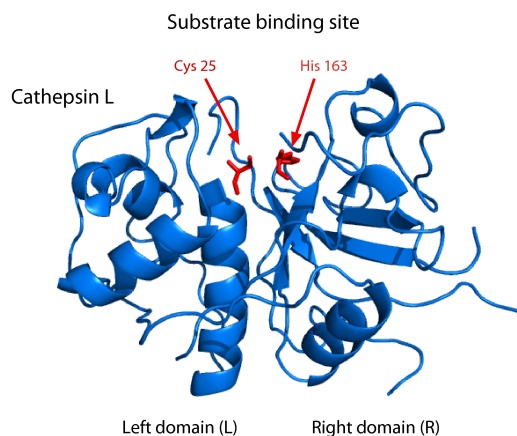


Εικόνα 6. Δομή καθεψίνης Κ

Η καθεψίνη Κ (**Εικ. 6**) είναι μια κυστεϊνοπρωτεάση που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1q21 και αποτελείται από 8 εξόνια. Αρχικά συντίθεται ως ανενεργό προένζυμο με 329 αμινοξέα (150). Κύριο χαρακτηριστικό της καθεψίνης Κ είναι ότι είναι η μόνη

καθεψίνη που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στους οστεοκλάστες. Η καθεψίνη K αποδομεί το κολλαγόνο τύπου I που αποτελεί οργανικό συστατικό της θεμέλιας ουσίας των οστών. Λόγω αυτής της βασικής λειτουργίας στην αρχική διαδικασία της οστικής απορρόφησης η καθεψίνη K αποτελεί θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης (151). Επιπλέον η καθεψίνη εκτός από τους οστεοκλάστες εκφράζεται σε μικρότερο επίπεδο και σε άλλους ιστούς και κύτταρα όπως στο δέρμα, στην καρδιά, στους πνεύμονες, στα λεία μυϊκά κύτταρα, στις ωοθήκες, στον πλακούντα, στο ήπαρ, στα μακροφάγα, στους οστεοβλάστες και στον καρκίνος του μαστού και του προστάτη (152).

5. Καθεψίνη L, V



Εικόνα 7. Δομή καθεψίνης L

Η καθεψίνη L (**Εικ. 7**) είναι μια κυστεϊνοπρωτεάση . Δύο διακριτές L καθεψίνες κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονίδιο της καθεψίνης L σε καθεψίνη L1 και καθεψίνη V (ή αλλιώς L2). Η καθεψίνη L1 δεν έχει ομόλογό της στα ποντίκια ενώ η καθεψίνη L των ποντικών είναι ομόλογη της ανθρώπινης καθεψίνης V (153). Μελέτες έχουν συσχετίσει την καθεψίνη L με την νεοαγγείωση, τη στεφανιαία νόσο, το ανεύρυσμα (154), την ευαλωτότητα των αθηρωματικών πλακών (155) και την υπερπλασία του αρτηριακού τοιχώματος μετά από αρτηριακό τραυματισμό (156). Επιπλέον υπερέκφραση της καθεψίνης L έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους

καρκίνου και έχει συσχετιστεί με την επιθετική μετάστασή τους και την κακή πρόγνωση των ασθενών (157).

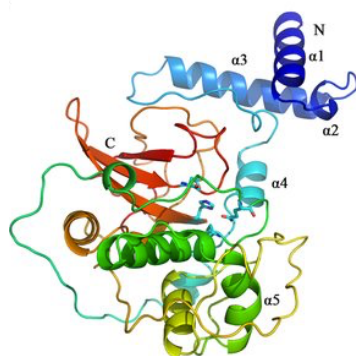
Η καθεψίνη V χαρτογραφήθηκε στην χρωμοσωμική περιοχή 9q22,2 η οποία βρίσκεται δίπλα στην αντίστοιχη θέση του γονιδίου της καθεψίνης L και παρουσιάζει 80% ταύτιση της πρωτεϊνικής ακολουθίας με αυτή της καθεψίνης L (158). Η καθεψίνη V εκφράζεται κυρίως στον θύμο αδένα και στους όρχεις (159). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση και στο επιθήλιο του κερατοειδούς διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία του (160).

6. Καθεψίνη O

Η καθεψίνη O είναι μια κυστεϊνοπρωτεάση που αποτελείται από 321 αμινοξέα. Το γονίδιο της καθεψίνης O συντίθεται από 8 εξόνια και 7 ιντρόνια και η κατανομή τους διαφέρει από αυτή των υπόλοιπων ανθρώπινων κυστεϊνικών πρωτεασών και τοποθετείται στο χρωμόσωμα 4q31-q32, μια μοναδική τοποθεσία της καθεψίνης O. Το γονίδιο της καθεψίνης O εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και παίζει σημαντικό ρόλο ως πρωτεολυτικό ένζυμο στην αποδόμηση των πρωτεϊνών ενδοκυττάρια (161).

Η πρώτη αναφορά στην καθεψίνη O έγινε το 1994 όπου cDNA της καθεψίνης απομονώθηκε από το μαστό ανθρώπου με καρκίνο μαστού (162). Η καθεψίνη O δρα ως ενδοπρωτεάση έναντι του ινωδογόνου σε όξινο pH, γεγονός που μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας (163).

7. Καθεψίνη W



Εικόνα 8. Δομή καθεψίνης W

Το γονίδιο της καθεψίνης W (**Εικ. 8**) τοποθετείται στο χρωμόσωμα 11q13,1 και περιέχει 10 εξόνια και 9 ιντρόνια. Συσχετίσεις των ακολουθιών των αμινοξέων των πρωτεασών έδειξαν ότι η καθεψίνη W παρουσιάζει ομόλογη ακολουθία με την καθεψίνη F σε πολύ μεγάλο ποσοστό (164). Η καθεψίνη W εκφράζεται αποκλειστικά στα κύτταρα φυσικούς φονείς και στα κυτταροτοξικά T κύτταρα έχοντας συγκεκριμένη λειτουργία στην ανοσοανταπόκριση (165).

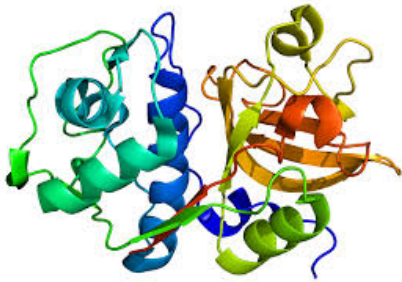
8. Καθεψίνη Z



Εικόνα 9. Δομή καθεψίνης Z

Το γονίδιο της καθεψίνης Z (**Εικ. 9**) έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 20, στη θέση 20q13. Η καθεψίνη Z είναι μια κυστεϊνοπρωτεάση στα λυσοσώματα και δρα ως εξωπεπτιδάση. Εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς του ανθρώπου και κυρίως στο ήπαρ, στο σπλήνα, στους πνεύμονες και στους νεφρούς (166). Η καθεψίνη Z έχει βρεθεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών νοσημάτων όπως η νόσος του Alzheimer και η νόσος Huntington. Επιπλέον αυξημένη έκφραση της καθεψίνης Z έχει παρατηρηθεί στον καρκίνο, στη γαστρίτιδα που σχετίζεται με το ελικοβακτηρίδιο, την πρωτοπαθή χολαγγειίτιδα και το σοβαρό τραύμα (167).

9. Καθεψίνη S

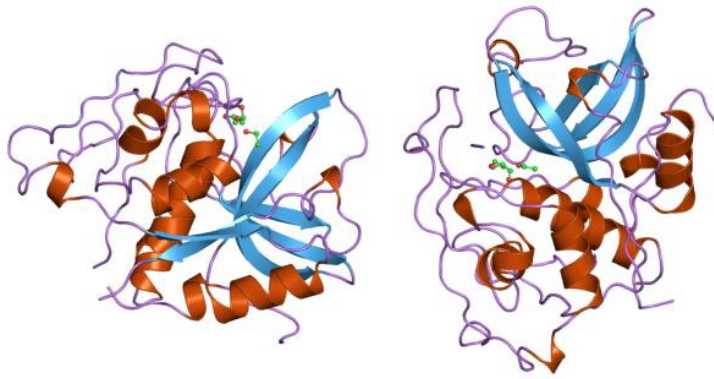


Εικόνα 10. Δομή καθεψίνης S

Η καθεψίνη S (**Εικ. 10**) είναι μια κυστεϊνοπρωτεάση με δράση ενδοπεπτιδάσης. Το γονίδιό της τοποθετείται στο χρωμόσωμα 1q21 και αρχικά συντίθεται ως προένζυμο αποτελούμενο από 331 αμινοξέα. Εκφράζεται έντονα στη λέμφο, στο σπλήνα και στα κύτταρα ανοσίας όπως τα μακροφάγα (168,169). Η καθεψίνη S διαθέτει την ιδιαιτερότητα να παραμένει ενεργή σε ουδέτερο pH (170), και άρα να μπορεί να δραστηριοποιηθεί και στον εξωκυττάριο χώρο (171).

Η καθεψίνη S παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια ποικίλων καρδιαγγειακών νοσημάτων όπως είναι η αθηροσκλήρυνση, το κοιλιακό αορτικό ανεύρυσμα καθώς και μετεμφραγματικά (172). Επιπλέον εμπλέκεται στο μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II και στην αποδόμηση της σταθερής αλυσίδας και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλά φλεγμονώδη νοσήματα όπως αυτοάνοσα νοσήματα, άσθμα, καρκίνος, κυστική ίνωση καθώς και στον διαβήτη και στην παχυσαρκία (173).

10. Καθεψίνη B



Εικόνα 11. Δομή καθεψίνης B

Η καθεψίνη B (**Εικ. 11**) είναι μια λυσοσωμική κυστεϊνική πρωτεάση που ανήκει στην οικογένεια παπαΐνης των ενζύμων. Αρχικά απομονώθηκε από το ανθρώπινο ήπαρ το 1979 (174) και η πρώτη ολοκληρωμένη πρωτεϊνική αλληλουχία απομονώθηκε από το ήπαρ ποντικού το 1983 (175). Η καθεψίνη B εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα και ιστούς όπως μακροφάγα, ηπατοκύτταρα, νεφρικά σωληνάκια, ινοβλάστες, πλακώδες επιθήλιο, γαστρεντερικό επιθήλιο, σιελογόνους αδένες και τροφοβλάστες (176).

Αρχικά συντίθεται ως προένζυμο αποτελούμενο από 339 αμινοξέα με υπολογιζόμενο βάρος 38kDa (177). Πρόκειται για μια δίλοβη πρωτεΐνη με το ενεργό κέντρο της κάθετα, ανάμεσα από τους δύο λοβούς (αριστερός και δεξιός λοβός). Τα αμινοξέα κυστεΐνη, ιστιδίνη και ασπαρτικό οξύ συνθέτουν την καταλυτική τριάδα ενζύμων με την κυστεΐνη στον αριστερό λοβό να αλληλεπιδρά με την ιστιδίνη στον δεξιό λοβό και να καταλύει πεπτιδικούς δεσμούς. Μοναδικό χαρακτηριστικό της καθεψίνης B είναι ο διττός της ρόλος ως ενδοπεπτιδάση και ως εξωπεπτιδάση. Ως ενδοπεπτιδάση η καθεψίνη B υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς ευνοώντας αμινοξέα με μεγάλη υδρόφοβη αλυσίδα στο P2 τμήμα του υποστρώματος της πρωτεΐνης /πεπτιδίου ενώ επιπλέον δέχεται την αργινίνη σε αυτό το τμήμα. Ως εξωπεπτιδάση η καθεψίνη B απομακρύνει δύο αμινοξέα από το καρβοξυτελικό άκρο (C άκρο) της πρωτεΐνης. Με αυτή την διπλή δράση, η καθεψίνη δρα στα πρώιμα και στα όψιμα στάδια της αποδόμησης των πρωτεϊνών από τα λυσοσώματα. Η καθεψίνη B διαθέτει επιπλέον ένα μοναδικό χαρακτηριστικό σε αντίθεση με άλλες καθεψίνες, καθώς διαθέτει ένα "occluding loop" το οποίο αποτελείται από 18 αμινοξέα μεταξύ Pro 107

και Asp 124, το οποίο μπλοκάρει μερικώς τον δεσμό στο ενεργό κέντρο περιορίζοντας έτσι την πρόσβαση του αναστολέα της καθεψίνης B, της συστατίνης. Η μετατόπιση της "occluding loop" είναι εξαρτώμενη από το Ph που διαμορφώνει την δραστηριότητά της ευνοώντας την δράση της ως εξωπεπτιδάση ή ως ενδοπεπτιδάση σε όξινο και ουδέτερο ή αλκαλικό Ph αντίστοιχα (178).

Η καθεψίνη B δραστηριοποιείται κυρίως στο όψιμο ενδόσωμα/λυσόσωμα και εμπλέκεται στην αποδόμηση των πρωτεϊνών και συμμετέχει σε διάφορα πρωτεολυτικά μονοπάτια μέσα στο κύτταρο. Η καθεψίνη B δύναται να ενεργοποιηθεί και από άλλες πρωτεάσες όπως η καθεψίνη D, η καθεψίνη G, τον αναστολέα του πλασμινογόνου (tPA) και της ουροκινάσης(uPA) και την ελαστάση (179). Επιπλέον μπορεί να υποστεί αυτοκατάλυση στο όξινο περιβάλλον των όψιμων ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων. Σε όξινο περιβάλλον η καθεψίνη B αποδομεί τους τύπους II, IX και XI του κολλαγόνου (180).

Η καθεψίνη B επιπλέον βρίσκεται και σε άλλα μέρη όπως στην επιφάνεια του κυττάρου από όπου αποδομεί πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας όπως η λαμινίνη, η φιμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο (180, 181, 182) και ενεργοποιεί εξωκυττάρια πρωτεολυτικά μονοπάτια. Η ενεργοποίηση της καθεψίνης στην κυτταρική μεμβράνη γίνεται από συνδετικές πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον στην επιφάνεια του κυττάρου η καθεψίνη B συνδέεται και με την θειική ηπαρίνη που αυτό έχει ως αποτέλεσμα της σταθεροποίησης του ενζύμου στο αλκαλικό Ph του εξωκυττάριας χώρου(183). Η υπερέκφραση και η δραστηριότητα της καθεψίνης B έχει συσχετιστεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως με τον καρκίνο (μαστού, προστάτη, εγκεφάλου, οισοφάγου, πεπτικού, πνεύμονα, ωοθηκών, θυρεοειδούς, δέρματος, καρκίνος εντέρου) την αρθρίτιδα, την παγκρεατίτιδα, τη νόσο του Αλτσχάιμερ, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και την αθηροσκλήρυνση.

4.6 Καθεψίνη B και αθηροσκλήρυνση.

Όπως προαναφέρθηκε η γήρανση είναι μια ήπια χρόνια προφλεγμονώδης διαδικασία που οδηγεί σε καρδιαγγειακά νοσήματα (184). Η καρδιαγγειακή γήρανση σχετίζεται με μηχανικές και δομικές διεργασίες στο αγγειακό τοίχωμα όπως το οξειδωτικό στρες, την αγγειακή φλεγμονή και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (55) . Η καταστροφή που επιφέρει η γήρανση στο κύτταρο έχει ως αποτέλεσμα την

απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων από το λυσόσωμα, με τις καθεψίνες να παίζουν κεντρικό ρόλο στην ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια αποδόμηση (185,186). Η καθεψίνη B που βρίσκεται στο ενδόσωμα και λυσόσωμα ανθρώπινων κυττάρων μπορεί να ενεργοποιηθεί και να απελευθερωθεί από διάφορα ερεθίσματα, όπως την όξυνση του κυττάρου που προκαλείται από την γήρανση (187,188) μέσω του οξειδωτικού στρες και της ήπιας φλεγμονής (188). Στην αθηροσκλήρυνση η καθεψίνη B συμμετέχει στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Τα μόρια της οξειδωμένης χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλης (LDL) προκαλούν απελευθέρωση της καθεψίνης B στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών και την απόπτωση (189,190). Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες TNF-α και TNF-γ αυξάνουν την έκκριση της καθεψίνης B από το λυσόσωμα, η οποία με την σειρά της επιδεινώνει την φλεγμονή (191) και αποδομεί την ελαστίνη της εξωκυττάριας ουσίας του αγγειακού ενδοθηλίου (192). Η αποδόμηση της ελαστίνης σχετίζεται με την αρτηριακή εκφύλιση, την ασβέστωση και την αρτηριακή σκληρία (193,194). Συμπερασματικά η καθεψίνη B εμπλέκεται στην αρτηριακή σκληρία και στην αθηροσκλήρυνση κυρίως μέσω της αγγειακής φλεγμονής και της πρωτεολυτικής δράσης της στις αθηρωματικές πλάκες, πιθανώς διευκολύνοντας την μετακίνηση των λείων μυϊκών κυττάρων στην αθηρωματική πλάκα μέσω της αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας και την μετακίνηση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα (195). Για παράδειγμα, η συσσώρευση κρυστάλλων χοληστερόλης στα μακροφάγα προκαλεί απελευθέρωση της καθεψίνης B στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος, ενός σημαντικού μορίου στην αθηρογένεση, την αγγειακή φλεγμονή και την ευαλωτότητα των αθηρωματικών πλακών (196,197). Επιπλέον αυξημένα επίπεδα της καθεψίνης B καθώς και mRNA της καθεψίνης B έχουν βρεθεί στον αυλό και στα μακροφάγα των αθηρωματικών βλαβών στο αορτικό τόξο και στην κοιλιακή αορτή ποντικών με έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E (198), ενώ στους ανθρώπους βρέθηκε αυξημένη έκφραση της καθεψίνης B, ιστολογικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λεία μυϊκά κύτταρα κοιλιακών αορτικών ανευρυσμάτων (199,200,201).

4.7 Καθεψίνη S και αθηροσκλήρυνση

Η καθεψίνη S είναι μια από τις πρώτες καθεψίνες που παρατηρήθηκαν στις αθηρωματικές βλάβες των ανθρώπων, ενώ οι φυσιολογικές αρτηρίες παρουσιάζουν

μικρές ποσότητες καθεψίνης S ή και καθόλου (202). Στις πρώιμες αθηροσκληρυντικές βλάβες η καθεψίνη S ανευρίσκεται στα λεία μυϊκά κύτταρα του μέσου και του έσω χιτώνα, ενώ στις προχωρημένες βλάβες η καθεψίνη S εντοπίζεται στα λεία μυϊκά κύτταρα της ινώδους κάψας, στα μακροφάγα και στις περιοχές αποδόμησης της ελαστίνης (206). Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα με έλλειψη του υποδοχέα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης αναφέρει ότι η έλλειψη καθεψίνης S οδήγησε σε μείωση της επιφάνειας των αθηρωματικών βλαβών κατά 60% μετά από 12 μήνη δυτικού τύπου διατροφή και επιπλέον συσχετίστηκε με μείωση των μακροφάγων των λείων μυϊκών ινών, των CD⁴⁺ T λεμφοκυττάρων, των λιπιδίων, του κολλαγόνου και των επιπέδων της ιντερφερόνης γ των αθηρωματικών πλακών (203). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε μελέτη σε επίμυες με έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης A (ApoE^{-/-}) καθώς η έλλειψη της καθεψίνης S οδήγησε σε μείωση της επιφάνειας των αθηρωματικών πλακών κατά 46% μετά από 12μηνη δυτικού τύπου διατροφή και μείωση της ρήξης των πλακών κατά 73% (204).

Η καθεψίνη S φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στον σχηματισμό ενδοθηλιακής υπερπλασίας και επομένως και στην επαναστένωση καθώς αυξημένη έκφραση της καθεψίνης S έχει βρεθεί σε λεία μυϊκά κύτταρα και σε διηθημένα μακροφάγα σε επίμυες με αναπτυσσόμενη ενδοθηλιακή υπερπλασία (205). Ένας μηχανισμός με τον οποίο η καθεψίνη S φαίνεται να συμβάλλει στην ενδοθηλιακή υπερπλασία είναι μέσω της συμβολής της στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και στην μετανάστευση των μακροφάγων μέσω της αποδόμησης της ελαστικής μεμβράνης (206).

Αυξημένη έκφραση της καθεψίνης S έχει αναφερθεί και σε ανευρύσματα κοιλιακών αορτών τόσο σε επίμυες (207) όσο και σε ανθρώπους (208). Η έλλειψη της καθεψίνης S σε επίμυες μείωσε σημαντικά την συχνότητα των κοιλιακών αορτικών ανευρυσμάτων, καθώς και την εξωτερική τους διάμετρο αλλά και την διάμετρο του αυλού των κοιλιακών αορτών(207). Η δραστηριότητα και η έκφραση της καθεψίνης S έχει βρεθεί ιδιαίτερα αυξημένη στο τοίχωμα των ανευρυσμάτων καθώς και στον τοιχωματικό θρόμβο των αορτικών ανευρυσμάτων στους ανθρώπους σε σχέση με φυσιολογικές αρτηρίες (209).

Ένας επιπλέον μηχανισμός μέσω του οποίου η καθεψίνη S φαίνεται να σχετίζεται με την αθηροσκλήρυνση είναι η νεοαγγειογένεση. Σε επίμυες με έλλειψη της

απολιποπρωτεΐνης E -/- παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένη η νεοαγγειογένεση και η έκφραση της καθεψίνης S στις προχωρημένες αθηρωματικές πλάκες ενώ η έλλειψη της καθεψίνης S σχετίστηκε με μείωση της νεοαγγειογένεσης των πλακών (210).

Παρόλο που η παθοφυσιολογία της καθεψίνης S στην αθηροσκλήρυνση χρήζει περαιτέρω έρευνας η καθεψίνη S ίσως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης καθώς μελέτες σε ανθρώπους αναφέρουν σημαντική συσχέτιση της καθεψίνης S στο αίμα με την αθηροσκλήρυνση και με τον σακχαρώδη διαβήτη μέσω της αποδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της φλεγμονώδους απάντησης (211), ενώ σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη τα επίπεδα της καθεψίνης S στο αίμα ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τους ασθενείς με σταθερή στηθάγχη και τον υγιή πληθυσμό υποστηρίζοντας έτσι μια πιθανή συσχέτιση της καθεψίνης S με την ευαλωτότητα της πλάκας (212).

4.8 Καθεψίνη S, Καθεψίνη B και αρτηριακή σκληρία

Όπως προαναφέρθηκε η γήρανση των μεγάλων αρτηριών σχετίζεται με δομικές και λειτουργικές αλλαγές όπως την καταστροφή των κυττάρων και των στοιχείων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, την αποδόμηση της ελαστίνης, την διαταραχή του μεταβολισμού της εξωκυττάριας ουσίας, την αύξηση της αναλογίας κολλαγόνου/ελαστίνης, την συσσώρευση σκληρότερων ιών κολλαγόνου, την αύξηση του ρυθμού γήρανσης και απόπτωσης των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων. Όλες αυτές οι αλλαγές οδηγούν στην μείωση της ελαστικότητας και την προοδευτική σκλήρυνση του αρτηριακού τοιχώματος. Επομένως οι καθεψίνες μέσω την αποδόμησης της ελαστίνης, της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της αυξημένης απόπτωσης των μακροφάγων φαίνεται να εμπλέκονται στην αρτηριακή σκλήρυνση. Βέβαια δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα στην βιβλιογραφία για να υποστηρίξουν αυτή τη συσχέτιση.

Η αρτηριακή σκληρία που ορίζει την βιολογική ηλικία των αγγείων είναι η συνιστάμενη της υποκείμενης αγγειακής ίνωσης και επασβέστωσης. Η αγγειακή ασβεστοποίηση φαίνεται να σχετίζεται σημαντικά με την αρτηριακή σκληρία. Μελέτη σε 900 γυναίκες έδειξε ότι η καρωτιδομηριαία ταχύτητα σφυγμικού κύματος cfPWV, δείκτης αρτηριακής σκληρίας, συσχέτιστηκε ανεξάρτητα με την ασβεστοποίηση του αρτηριακού τοιχώματος (213). Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα

έχουν συσχετίσει την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας με τη έναρξη της αγγειακής ασβεστοποίησης. Βασικός ρυθμιστής της αγγειακής ασβεστοποίησης είναι ο διαταραγμένος μεταβολισμός των μεταλλικών στοιχείων. Κλινικές και προκλινικές μελέτες υποστηρίζουν την συμμετοχή της αρτηριακής ασβεστοποίησης στην ρήξη των πλακών. Η αγγειακή και βαλβιδική επασβέστωση συμβαίνει μέσω μοριακών διαδικασιών που χαρακτηρίζονται από την έκφραση οστεογενετικών πρωτεϊνών και πρωτεασών που αποδομούν την εξωκυττάρια ουσία. Σε επίμυες ApoE^{-/-} με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια η έλλειψη της καθεψίνης S φάνηκε να σχετίζεται με την υποστροφή της αρτηριακής και της βαλβιδικής ασβεστοποίησης, ενώ η έκφραση και η δραστηριότητα της καθεψίνης S, μέσω αποδόμησης της ελαστίνης φάνηκε να επιταχύνει την αρτηριακή και την βαλβιδική ασβεστοποίηση στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (214). Επομένως η καθεψίνη S θα μπορούσε μέσω της αποδόμησης της ελαστίνης και της προώθησης της αρτηριακής επασβέστωσης να παίζει σημαντικό ρόλο στην αρτηριακή σκλήρυνση. Μελέτη σε 200 ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σταδίου 3 και 4 συσχέτισε ανεξάρτητα την καθεψίνη S του πλάσματος με την ταχύτητα σφυγμικού κύματος στην αορτή τόσο στις αρχικές τιμές βάσης όσο και μετά από 3 έτη παρακολούθησης των ασθενών (215). Ενώ για την συσχέτιση της καθεψίνης S με την αρτηριακή σκληρία τα δεδομένα που υπάρχουν στην βιβλιογραφία είναι ελάχιστα, για την συσχέτιση της καθεψίνης B με την αρτηριακή σκληρία δεν υπάρχουν καθόλου δεδομένα.

4.9 Καθεψίνη B και καθεψίνη S ως προγνωστικοί δείκτες καρδιαγγειακών συμβαμάτων

Η καθεψίνη B και η καθεψίνη S έχουν συσχετιστεί με την σταδιοποίηση των αθηρωματικών πλακών και την συμπτωματολογία τους καθώς έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση αυτών στις αθηρωματικές πλάκες, γεγονός που συνηγορεί ότι αυτά τα μόρια θα μπορούσαν πιθανόν να χρησιμοποιηθούν όχι μόνο ως διαγνωστικοί δείκτες της ευαλωτότητας της αθηρωματικής πλάκας (216), αλλά και ως προγνωστικοί δείκτες καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο φάνηκε ότι η αύξηση του κινδύνου για καρδιαγγειακά συμβάντα σχετίζεται με υψηλότερες τιμές καθεψίνης B στο αίμα (217), ενώ υψηλότερες τιμές καθεψίνης B παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο σε σχέση με ασθενείς χωρίς καρδιαγγειακό

σύνδρομο (218). Επιπλέον και υψηλές τιμές της καθεψίνης S παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και ασταθή στηθάγχη (211), ενώ έχει φανεί ότι η καθεψίνη S σχετίζεται με την θνητότητα σε ηλικιωμένους ασθενείς (219). Παρόλο που ο ρόλος της καθεψίνης B και της καθεψίνης S στα όψιμα στάδια της αθηροσκλήρυνσης έχει μελετηθεί εκτενώς, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την κλινική τους σημασία στα αρχικά στάδια της αθηροσκλήρυνσης. Υπάρχουν δεδομένα για την αύξηση των επιπέδων της καθεψίνης B στο αίμα σε υγιείς ανθρώπους με την ηλικία, αλλά η συσχέτιση της με δείκτες καρδιαγγειακής γήρανσης όπως η αρτηριακή σκληρία παραμένει άγνωστη. Η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών που αφορούν την αγγειακή λειτουργία θα συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή, στην έγκαιρη διάγνωση και στην στοχευμένη θεραπεία για την επιβράδυνση της αρτηριακής εκφύλισης. Στόχος αυτής της διατριβής είναι να ερευνήσει την συσχέτιση της καθεψίνης B και της καθεψίνης S με την αρτηριακή σκληρία και την υποκλινική αθηρωμάτωση σε ασθενείς που ανήκουν σε διάφορες ομάδες καρδιαγγειακού κινδύνου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

5.1 Υπόθεση

Όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στο γενικό μέρος της παρούσας διατριβής, είναι γνωστό ότι οι καθεψίνες που βρίσκονται στα λυσοσώματα συμμετέχουν στην αποδόμηση και αναδιοργάνωση των πρωτεϊνών των κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας. Λόγω αυτής της πρωτεολυτικής τους ικανότητας εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις και έχουν συσχετιστεί με διάφορα νοσήματα. Από την βιβλιογραφία προκύπτουν αρκετές μελέτες με αντικείμενο έρευνας την δραστηριότητα των καθεψινών στην αθηροσκλήρυνση (220,221) με περισσότερο μελετημένη εξ αυτών την καθεψίνη S.

Οι αθηρωματικές βλάβες περιέχουν υψηλότερα επίπεδα mRNA αλλά και πρωτεΐνης καθεψίνης S σε σχέση με τις φυσιολογικές αρτηρίες (202). Η καθεψίνη S φαίνεται να υπερεκφράζεται σε αθηρωματικές πλάκες ανθρώπων και πειραματικών μοντέλων και πιθανόν παίζει σημαντικό ρόλο και στην αγγειακή αναδιαμόρφωση καθώς αυξημένα επίπεδα έκφρασης του mRNA και της πρωτεΐνης της καθεψίνης S έχουν παρατηρηθεί στην επαναστένωση αρτηριών μετά από αγγειοπλαστική (205,222). Επιπλέον φαίνεται ότι η φλεγμονή που υπερισχύει στην αθηρωμάτωση ενισχύει περαιτέρω την αυξημένη έκκριση και έκφραση της καθεψίνης S από τα μακροφάγα μέσω των κυτταροκινών που εκκρίνονται, όπως της ιντερλευκίνης 1β, του παράγοντα νέκρωσης όγκου -α και της ιντερφερόνης γ (223,224). Εκτός από τις αθηρωματικές πλάκες, αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης της CTSS έχουν βρεθεί και σε ανευρύσματα κοιλιακής αορτής και εγκεφάλου σε ανθρώπους (208,223), ενώ σε πειραματικά μοντέλα με έλλειψη της συστατίνης C, του κυριάρχου αναστολέα της CTSS, φάνηκε ότι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των καθεψινών και της συστατίνης C στο αρτηριακό τοίχωμα προάγει την φλεγμονή στα ανευρύσματα και επομένως και την πρωτεολυτική δράση των καθεψινών καθώς και την αποδόμηση και την προοδευτική λέπτυνση του αρτηριακού τοιχώματος(225), δημιουργώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο. Η καθεψίνη S φαίνεται να εμπλέκεται και στην νεοαγγειογένεση καθώς η έλλειψη της καθεψίνης S μείωσε την ανάπτυξη μικροαγγείων. Είναι γνωστό ότι η νεοαγγειογένεση συμβάλει στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, μια διαδικασία που εξαρτάται άμεσα από την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και της βασικής ενδοθηλιακής μεμβράνης, όπου επιτρέπει την διείσδυση των ενδοθηλιακών κυττάρων

στο ενδιάμεσο χώρο(226). Η καθεψίνη S με τον ρόλο που έχει στην αναδιαμόρφωση των αγγείων επηρεάζει την εξέλιξη και την ευαλωτότητα της αθηρωματικής πλάκας καθώς σε πειραματικά μοντέλα η έλλειψη καθεψίνης S μείωσε το μέγεθος των αθηρωματικών πλακών (203) και σχετίστηκε με χαρακτηριστικά λιγότερο σταθερής πλάκας (204), ενώ σε ανθρώπους παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της καθεψίνης S στις ευάλωτες περιοχές των πλακών (227).

Αναφορικά με την θρόμβωση και την ρήξη των αθηρωματικών πλακών, η έλλειψη της καθεψίνης S σε ποντικούς οδήγησε σε λιγότερες ρήξεις πλακών, ενώ ο μηχανισμός με τον οποίο η καθεψίνη S εμπλέκεται στην ρήξη και την θρόμβωση παραμένει αδιευκρίνιστος. Μηχανιστικές μελέτες για την ρήξη της πλάκας μειονεκτούν λόγω έλλειψης αξιόπιστων πειραματικών μοντέλων (228). Ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η καθεψίνη S προάγει την ρήξη της πλάκας είναι μέσω της αρτηριακής ασβεστοποίησης καθώς σε πειραματικά μοντέλα με νεφρική ανεπάρκεια η καθεψίνη S μέσω της ελαστόλυσης επιτάχυνε την αρτηριακή επασβέστωση (214). Μελέτες έχουν παρατηρήσει συσχέτιση της έκφρασης της καθεψίνης S με την ΣΝ(211,229,230), γεγονός που υποστηρίζει την εμπλοκή της καθεψίνης S στην ρήξη και στην ευαλωτότητα της πλάκας, χωρίς όμως να έχει δοθεί μια άμεση μηχανιστική εξήγηση. Βέβαια τα αποτελέσματα των μελετών που συσχετίζουν την καθεψίνη S με την στεφανιαία νόσο είναι συγκεχυμένα. Σε μελέτες όπου η καθεψίνη S σχετίζεται με την ΣΝ, οι ασθενείς με ασταθή στηθάγχη είχαν αυξημένα επίπεδα καθεψίνης S πλάσματος σε σχέση με ασθενείς με σταθερή ΣΝ (212), ενώ τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της CTSS ήταν αυξημένα σε ασθενείς με ΣΝ σε σχέση με υγιή πληθυσμό, χωρίς να υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στις υποομάδες με OEM και σταθερή ΣΝ(229). Αντίθετα σε άλλη μελέτη η καθεψίνη S πλάσματος έχει βρεθεί οριακά αυξημένη σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο επεισόδιο σε σχέση με ασθενείς χωρίς ΣΝ(231), ενώ μειωμένη έκφραση της CTSS έχει παρατηρηθεί στα ΛΜΚ προχωρημένων πλακών (138).

Αναφορικά με την σχέση της καθεψίνης B και την αθηροσκλήρυνση, από μελέτες προκύπτει ότι και η καθεψίνη B εμπλέκεται σε διάφορα στάδια εξέλιξης των αθηρωματικών πλακών. Υπερέκφραση καθεψίνης B παρατηρήθηκε σε εγκεφαλικά ανευρύσματα ανθρώπων και ποντικών, με κύρια πηγή αυτών τα μακροφάγα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και λιγότερο τα ενδοθηλιακά κύτταρα (208). Σε πειραματικά μοντέλα

η καθεψίνη B βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε αθηρωματικές πλάκες με υψηλό φορτίο φλεγμονής υποστηρίζοντας τον ρόλο της καθεψίνης B στην ευαλωτότητα της πλάκα(232), ενώ η CTSB έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε μακροφάγα αφρώδη κύτταρα που βρίσκονται στους νεκρωτικούς πυρήνες και στις ινώδεις κάψες των πλακών (138).

Όσον αφορά την κλινική εκδήλωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων, από την βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες αναφορές. Αυξημένα επίπεδα CTSB πλάσματος έχουν βρεθεί σε ασθενείς με OEM σε σχέση με υγιή πληθυσμό (218), ενώ η έκφραση του mRNA της CTSB δεν φάνηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών με σταθερή ΣΝ, OEM και του υγιή πληθυσμού (229). Εκτός από την στεφανιαία νόσο αυξημένη δραστηριότητα καθεψίνης B έχει παρατηρηθεί σε ασταθείς πλάκες καρωτίδων συμπτωματικών ασθενών(199). Επιπλέον η καθεψίνη B φαίνεται ότι εμπλέκεται και στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλιάς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς αυξάνεται η δραστηριότητά της στους ιστούς της ισχαιμούσας περιοχής του μυοκαρδίου αποδομώντας κατά κύριο λόγο μυοϊνωδείς πρωτεΐνες όπως την MHC, την α-ακτίνη και την τροπονίνη-I. Τα μυοκαρδιακά κύτταρα της ισχαιμούσας περιοχής φαίνεται να περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα καθεψίνης B από ότι τα υγιή κύτταρα πιθανόν λόγω απελευθέρωσης των ενζύμων από το λυσόσωμα στο κυτοσόλιο και την διαρροή αυτών από την πληγείσα κυτταρική μεμβράνη(233). Η καθεψίνη B σχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με το κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλιάς σε ασθενείς με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια υποστηρίζοντας τον πιθανό ρόλο της καθεψίνης B στην αποδόμηση μυοκυττάρων, χωρίς να είναι σαφής ο μηχανισμός (234), ενώ η αναστολή της καθεψίνης B σε ποντικούς μετά από έμφραξη της προσθίου κατιόντα κλάδου μείωσε την μυοκαρδιακή ίνωση και την συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλιάς πιθανόν μέσω αναστολής της δράσης του μονοπατιού του φλεγμονοσώματος NLRP3 (235)

Ενώ υπάρχουν δεδομένα κυρίως από πειραματικά μοντέλα για την συσχέτιση των καθεψινών B και S με την αθηρωμάτωση και την αυξημένη έκφραση αυτών στις ευάλωτες πλάκες, λίγα είναι γνωστά για την συσχέτιση αυτών με την κλινική εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου, την βαρύτητάς της ΣΝ, καθώς και τον μηχανισμό με τον οποίο εμπλέκεται σε αυτή.

Από την βιβλιογραφία, η σχέση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων με την αθηροσκλήρυνση είναι επαρκώς αποδεδειγμένη (236). Η αθηροσκλήρυνση εξελίσσεται μέσα από την κλιμακωτή σχέση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων, καθώς πρώτα αυξάνονται τα μονοκύτταρα μέσω πολλαπλασιασμού των αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών και στο σπλήνα (237-239), στην συνέχεια τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα διαπηδούν στο αγγειακό τοίχωμα και διαχωρίζονται σε μακροφάγα (240-243) και τέλος τα μακροφάγα πολλαπλασιάζονται στις πλάκες. Επιπλέον αναφορικά με την αθηροσκλήρυνση, προκλινικές μελέτες υποστηρίζουν τον βασικό ρόλο που έχουν οι αλλαγές στα γονίδια και στα μονοπάτια σηματοδότησης μέσα στα μονοκύτταρα, στην εξέλιξη και στην πρόοδο της αθηροσκλήρυνσης (244). Χάρη στην εφαρμογή των μικροσυστοιχιών - microarrays (245) είναι πια εφικτή η ανάλυση της έκφρασης του mRNA τους. Ως εργαστηριακή μέθοδος φαίνεται να πλεονεκτεί η έκφραση του mRNA των πρωτεϊνών σε σχέση με την μέτρηση πρωτεΐνης πλάσματος καθώς έχει φανεί ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών στο πλάσμα να επηρεάζονται από την πρόσμιξη των ερυθροκυττάρων (246). Με βάση τα παραπάνω η έκφραση του mRNA των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος των καθεψινών φαίνεται να εκφράζει πιο άμεσα και αξιόπιστα την έκφραση της πρωτεΐνης από ότι η πρωτεΐνη πλάσματος.

Η απόκτηση νέων κλινικών δεδομένων σχετικά με την επίδραση των καθεψινών στο καρδιαγγειακό σύστημα έχει πρακτική σημασία για τους εξής λόγους:

1. Ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών στην καρδιαγγειακή νόσο. Η πρόωμη διάγνωση και αντιμετώπιση της ΣΝ αυξάνει σημαντικά την επιβίωση αυτών των ασθενών. Η βελτιστοποίηση της στρατηγικής πρόληψης για την μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου συνιστά τη χρήση συνδυασμού βιοδεικτών για την αναγνώριση των ασθενών υψηλού κινδύνου. Η καθεψίνες Β και S πληρούν παθοφυσιολογικά κριτήρια για την περαιτέρω διερεύνηση της κλινικής αξίας τους στον άνθρωπο ως πιθανοί νεότεροι βιοδείκτες στη ΚΑ νόσο (247).

2. Μηχανιστική εξήγηση της δράσης των καθεψινών στην καρδιαγγειακή νόσο στον άνθρωπο. Με τις μέχρι τώρα μελέτες κυρίως σε προκλινικό στάδιο έχουν αναπτυχθεί

θεωρίες ως προς τους μηχανισμούς που η CTSB και η CTSS συμμετέχουν κυρίως στην πρόωμη αθηρογένεση αλλά ελάχιστα είναι γνωστά για τον τρόπο και το βαθμό που οι καθεψίνες συμμετέχουν στην αγγειακή γήρανση αλλά και στην καρδιαγγειακή νόσο, τόσο στην σταθερή ΣΝ, όσο και στην οξεία εκδήλωση της νόσου. Από την βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες κλινικές μελέτες ως προς την συσχέτιση της CTSB και της CTSS με την στεφανιαία νόσο, οι οποίες παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα.

3. Ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων στην καρδιαγγειακή νόσο. Η κλινική ερμηνεία των μηχανισμών δράσης των καθεψινών θα συμβάλλει περαιτέρω σε μια νέα θεραπευτική προσέγγιση της καρδιαγγειακής νόσου με την ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων της CTSB και της CTSS. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αλλαγές των επιπέδων των καθεψινών και του βασικού αναστολέα τους, της συστατίνης C, στις αθηρωματικές πλάκες και στα ανευρύσματα στους ανθρώπους, αλλά και στις ισχαιμούσες και υπερτροφικές καρδιές, υποστηρίζουν ότι αυτές οι πρωτεάσες θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιοδείκτες στην εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον η καθεψίνη B έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε ασθενείς με σταθερή ΣΝ (217), ενώ δύο μεγάλες μελέτες συσχέτισαν την καθεψίνη S με την καρδιαγγειακή θνητότητα (220). Επομένως η επιλεκτική αναστολή των καθεψινών στους ασθενείς υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου μπορεί να έχει κλινική σημασία. Την τελευταία δεκαετία έχει γίνει προσπάθεια ανάπτυξης αναστολέων των καθεψινών. Υπάρχουν λίγα δεδομένα από εργαστηριακές και προκλινικές μελέτες όπου αναστολείς της καθεψίνης B (VBY-376) και S έδειξαν ελπιδοφόρα αποτελέσματα ως προς την θεραπεία διαφόρων νοσημάτων όπως αυτοάνοσα, καρκίνος και ηπατοπάθεια(248,249), ενώ οι περισσότερες κλινικές μελέτες με αναστολείς της καθεψίνης S τερματίστηκαν μετά την φάση I (220). Μόνο ο αναστολέας της καθεψίνης S RWH-445380 έφτασε έως την φάση IIa (250). Όσον αφορά την αγγειακή νόσο, προκλινική μελέτη έδειξε μείωση των καθεψινών B και S, καθώς και μείωση της συχνότητας των προχωρημένων ανευρυσμάτων μετά από θεραπεία με τον αναστολέα NC-2300 (208). Με βάση τα παραπάνω οι καθεψίνες B και S φαίνεται να είναι ένας λογικός φαρμακευτικός στόχος στην καρδιαγγειακή νόσο που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Με βάση τα παραπάνω, υποθέσαμε ότι ο βαθμός έκφρασης της καθεψίνης B και S στα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) σχετίζεται με την παρουσία και την έκταση της αθηρωμάτωσης στον άνθρωπο.

5.2 Σκοπός του πρωτοκόλλου

Σκοπός αυτής της διατριβής είναι:

- να διερευνήσει την συσχέτιση της έκφρασης της καθεψίνης B και της καθεψίνης S, στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, με αγγειολογικούς δείκτες αρτηριακής σκληρίας χρησιμοποιώντας μεθόδους ανάλυσης του σφυγμικού κύματος.
- να εξετάσει την συσχέτιση της καθεψίνης B και της καθεψίνης S με την παρουσία και την έκταση της αθηρωμάτωσης σε τέσσερα αγγειακά δίκτυα, τις στεφανιαίες αρτηρίες, τις καρωτίδες, τις μηριαίες αρτηρίες, την αορτή και του συνολικού αθηρωματικού φορτίου.
- να εξετάσει την συσχέτιση της καθεψίνης B και της καθεψίνης S σε διάφορα στάδια καρδιαγγειακού κινδύνου, δηλαδή σε πληθυσμό χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο (εκτίμηση υποκλινικής νόσου), σε πληθυσμό με γνωστή σταθερή στεφανιαία νόσο και σε πληθυσμό με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο.

5.3 Σχεδιασμός και μέθοδοι

Πρόκειται για διατμητικού τύπου μελέτη (cross - sectional)

5.3.1 Πληθυσμός

Για τους σκοπούς του πρωτοκόλλου συμπεριελήφθησαν 249 άτομα τα οποία διαχωρίστηκαν σε τρεις υποομάδες:

1. 162 άτομα από τον γενικό πληθυσμό της πόλης των Αθηνών, οι οποίοι δεν είχαν ιστορικό χρόνιου καρδιαγγειακού νοσήματος και δεν παρουσίαζαν συμπτώματα καρδιαγγειακής νόσου
2. 51 ασθενείς με ιστορικό σταθερής στεφανιαίας νόσου, επιβεβαιωμένο αγγειογραφικά (ομάδα σταθερής ΣΝ)

3. 36 ασθενείς που προσήλθαν στην μονάδα εντατικής θεραπείας του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα των Αθηνών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, σε διάστημα 12 ωρών από την εμφάνιση των συμπτωμάτων και στους οποίους διενεργήθηκε στεφανιογραφικός έλεγχος (ομάδα OEM).

Σε όλο το πληθυσμό έγινε καταγραφή πλήρους ατομικού ιστορικού, το οποίο περιελάμβανε δημογραφικά στοιχεία, προδιαθεσικούς παράγοντες κινδύνου, καρδιολογικό ιστορικό και φάρμακα. Τυχαίο δείγμα (40% του πληθυσμού) επανεξετάσθηκε για την εκτίμηση της προόδου της αρτηριακής σκληρίας 3 έτη μετά την πρώτη εξέταση. Η επανεξέταση όλου του πληθυσμού δεν ήταν δυνατή κατά τη διάρκεια διενέργειας της διατριβής για λογιστικούς λόγους (υψηλό κόστος, περιορισμοί στον υλικοτεχνικό εξοπλισμό και στα αναλώσιμα για την διενέργεια αγγειολογικών και αιματολογικών εξετάσεων, περιορισμοί στο διαθέσιμο προσωπικό). Επιπλέον η επανεξέταση δεν αποτελούσε έναν από τους πρωτεύοντες σκοπούς της διατριβής.

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης παρουσιάζονται στο τμήμα των αποτελεσμάτων της διατριβής. Η παρουσία παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο καταγράφηκε προσεκτικά βάσει του ιατρικού ιστορικού, την κλινική εξέταση και των αποτελεσμάτων των βιοχημικών δοκιμασιών (γλυκόζης αίματος και των λιπιδίων). Ως καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου ορίστηκαν οι κάτωθι: η αρτηριακή υπέρταση (συστολική αρτηριακή πίεση >140 χιλιοστά Hg και / ή διαστολική αρτηριακή πίεση > 90 mm Hg, μετά από 2 μετρήσεις της αρτηριακής πίεσης, σε 2 διαδοχικές επισκέψεις καθώς και η λήψη θεραπείας για την υπέρταση), το κάπνισμα (ενεργό ή διακοπή αυτού σε πιο πρόσφατο στάδιο, τους τελευταίους 6 μήνες), ο σακχαρώδης διαβήτης(επίπεδα γλυκόζης νηστείας στο αίμα > 126 mg / dL ή παρουσία αυτού στο κλινικό ιστορικό ή λήψη θεραπείας) και τέλος η υπερλιπιδαιμία (λήψη υπολιπιδαιμικής αγωγής ή επίπεδο λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας πάνω από το φυσιολογικό όριο όπως αυτό οριοθετείται από τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες). Το ιστορικό στεφανιαίας νόσου επιβεβαιώθηκε με προηγούμενη στεφανιογραφία ενώ η διάγνωση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου επιβεβαιώθηκε κλινικά με ηλεκτροκαρδιογραφικά κριτήρια, επίπεδα καρδιακών ενζύμων και στεφανιογραφικό

έλεγχο. Τα φάρμακα που κατεγράφησαν κυρίως ήταν αντιαιμοπεταλιακά, ασπιρίνη, αντιπηκτικά, υπολιπιδαιμικά, αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου, ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II, ανταγωνιστές των διαύλων ασβεστίου, αντιστηθαγγθικά, διουρητικά, και αμιωδαρόνη.

Κριτήριο αποκλεισμού από την μελέτη ήταν το αυτοάνοσο νόσημα, η οξεία νεφρική ανεπάρκεια, το οξύ αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, το ενεργό λοιμώδες ή φλεγμονώδες νόσημα και η κακοήθεια.

Όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη παρείχαν γραπτή συγκατάθεση ενώ το σύνολο της ερευνητικής δραστηριότητας που περιγράφεται στην παρούσα διατριβή έλαβε την έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας και Ηθικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα(14.10.2015).

Πριν τη μελέτη, τα άτομα κλήθηκαν να απέχουν από τη χρήση καπνού, αλκοόλ και καφεΐνης για 24 ώρες και από τη λήψη τροφής για 12 ώρες. Οι μελέτες έγιναν σε όλους τους ασθενείς σε ύπτια θέση -εκτός από την ανάλυση του παλμικού κύματος που πραγματοποιήθηκε με τον εξεταζόμενο σε καθιστή θέση- σε εξεταστικό δωμάτιο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (20 ° C έως 25 ° C). Όλες οι αγγειακές μετρήσεις ολοκληρώθηκαν σε μια επίσκεψη στο χρονικό διάστημα μεταξύ 09.30 - 11:30 π.μ. με βάση τα προηγούμενα δεδομένα που δείχνουν τη μικρότερη παρατηρούμενη διακύμανση των υπό εξέταση βιολογικών παραμέτρων στο εύρος του συγκεκριμένου χρονικού παραθύρου. Οι περιφερικές πιέσεις μετρήθηκαν σε κάθε συμμετέχοντα δύο φορές με μεσοδιάστημα ενός λεπτού χρησιμοποιώντας την αυτοματοποιημένη συσκευή Omron 705IT (Omron) και αφού είχε προηγηθεί ανάπαυση στην καθιστή θέση για 5 λεπτά. Ο μέσος όρος των μετρήσεων αυτών χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των δεδομένων. Τα ανθρωπομετρικά δεδομένα που καταγράφηκαν περιλαμβάνουν ύψος και βάρος, περίμετρος κοιλιάς και γοφών και δείκτης μάζας σώματος. Καταγράφηκε επίσης η επαγγελματική απασχόληση, το ιατρικό ατομικό και οικογενειακό ιστορικό, οι καπνιστικές συνήθειες και η κατανάλωση αλκοόλ. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι να τονιστεί πως οι αγγειολογικές εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν με καθορισμένη και επαναλαμβανόμενη σειρά από τον ίδιο χειριστή που αγνοούσε το ιατρικό ιστορικό: μέτρηση ταχύτητας σφυγμικού

κύματος και προσδιορισμός αθηρωματικών πλακών στις καρωτίδες και μηριαίες αρτηρίες.

5.3.2 Βιοχημικές μετρήσεις

Η ομάδα ελέγχου και η ομάδα με σταθερή ΣΝ υπεβλήθησαν σε αιμοληψία νηστείας (τουλάχιστον 10 ώρες από το τελευταίο γεύμα και πριν την λήψη φαρμάκων), ενώ η ομάδα OEM υπεβλήθη σε αιμοληψία με μέγιστο διάστημα 12 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων.

Από κάθε άτομο έγινε λήψη ολικού αίματος 20ml. Το προϊόν της αιμοληψίας περιφερικού αίματος συλλέχθηκε σε περιέκτες πήγματος για τον βιοχημικό έλεγχο και σε περιέκτες με αντιπηκτικό παράγοντα - αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) για την απομόνωση των κυττάρων και τον αιματολογικό έλεγχο.

Οι περιέκτες με το πήγμα αφέθηκαν 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρηση στο Βιοχημικό Τμήμα του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα.

Από τον ορό του προέκυψε πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός βασικών παραμέτρων ρουτίνας του αίματος και καθορισμός λιπιδιολογικού προφίλ όπως ολική χοληστερόλη (TChol), λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) και γλυκόζης. Στην ομάδα OEM προσδιορίστηκε επιπλέον η υψηλής ευαισθησίας τροπονίνη I χρησιμοποιώντας το διαγνωστικό τεστ τροπονίνης I Pathfast σε δείγμα ορού αίματος με αντιπηκτικό παράγοντα. Για την εκτίμηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (eGFR) χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση MDRD (Modification of Diet in Renal Disease). Η εξίσωση περιλαμβάνει τη χρήση τεσσάρων παραμέτρων την κρεατινίνης ορού, την ηλικία, το φύλο και την εθνικότητα.

5.3.3 Απομόνωση μονοπύρηνων από το περιφερικό αίμα (PBMCs)

Για την απομόνωση των μονοπυρήνων χρησιμοποιήθηκαν 5 ml φλεβικού αίματος καθώς 4ml είναι η ελάχιστη ποσότητα ώστε να προκύψει η επιθυμητή συγκέντρωση των $>10^6$ κύτταρα /ml θρεπτικού υλικού που χρειάζονται για την εκχύλιση επαρκούς ποσότητας RNA.

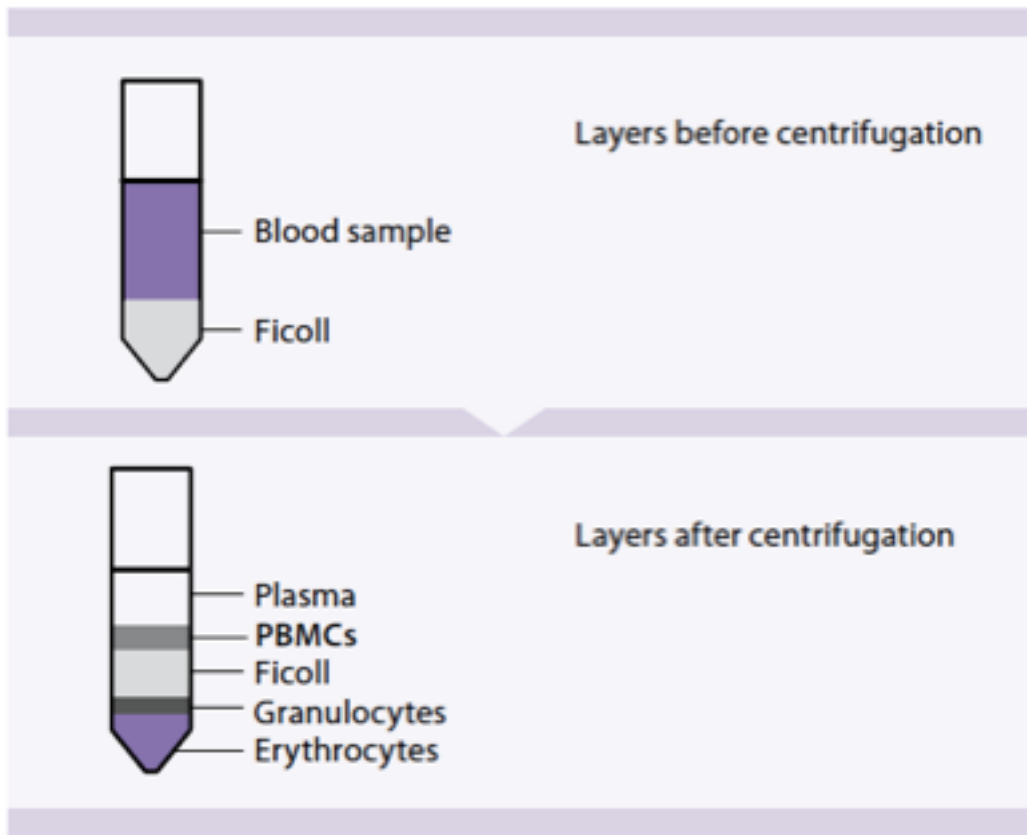
Η απομόνωση των μονοπύρηνων μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος έγινε με εφαρμογή ειδικού πρωτοκόλλου. Με τη χρήση του ειδικού μίγματος αντισωμάτων δεσμεύονται όλα τα κύτταρα του περιφερικού αίματος, εκτός των μονοκυττάρων,

σχηματίζοντας ροζέτες με τα ερυθρά αιμοσφαίρια και στη συνέχεια απομακρύνονται με φυγοκέντρηση μετά από επιστοίβαξη με χρήση διαλύματος φικόλης (Ficoll πυκνότητας $d=1.077\text{g/ml}$).

Βήματα απομόνωσης μονοπυρήνων:

1. Συλλογή 5 ml σε αντιπηκτικό EDTA το οποίο ανακινείται με ήπιες κινήσεις και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά έως 2 ώρες.
2. Αραίωση των 5ml αίματος με 10 ml ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} , L1835) σε κωνικό σωλήνα και ανακίνηση του δείγματος με ήπιες κινήσεις.
3. Μεταφορά διαλύματος 7.5 ml φικόλης ($D=1.077$ στους 20°C ; Biochrom, Cat. No. L6115) σε κωνικό σωλήνα φυγόκεντρου των 50 ml.
4. Ακολουθεί αργή επιστοίβαξη του αραιωμένου αίματος πάνω στο υλικό διαχωρισμού, τη φικόλη, στην οποία σχηματίζεται μια κόκκινη στοιβάδα. Οι ροζέτες που σχηματίζονται οφείλονται στην μικρότερη πυκνότητα της φικόλης από αυτή των ερυθροκυττάρων, των κοκκιοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων, ενώ σε σχέση με τα μονοπύρηνα η φικόλη έχει μεγαλύτερη πυκνότητα. Η επιστοίβαξη γίνεται στα τοιχώματα του σωλήνα για να μην αναταράξει τη σχηματιζόμενη στοιβάδα και είναι αποδοτική εάν προκύψουν δύο σαφώς διαχωρισμένες στοιβάδες, τη στοιβάδα της φικόλης και άνωθεν τη στοιβάδα του αραιωμένου δείγματος.
5. Ο δοκιμαστικός σωλήνας φυγοκεντρείται στις 1000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
6. Μετά τη φυγοκέντρηση προκύπτει διάλυμα πολλών στοιβάδων διαφορετικού χρώματος καθώς τα κύτταρα που όπως προαναφέρθηκε έχουν σχηματίσει ροζέτες διέρχονται διά της φικόλης και σχηματίζουν ίζημα στον πυθμένα του σωληνάριου, ενώ τα μονοπύρηνα σχηματίζουν μια στοιβάδα με τη μορφή νεφελώματος στην περιοχή μεταξύ πλάσματος και φικόλης (**Εικ. 12**).

Εικόνα 12. Στοιβάδες κυττάρων πριν και μετά την φυγοκέντρηση με διάλυμα φικόλης.



7. Με μικροπιπέτα και ιδιαίτερα λεπτούς χειρισμούς ώστε να μην αναταραχθούν οι διαφορετικές στοιβάδες αναρροφάται ο λευκός δακτύλιος των μονοπύρηνων.
8. Ακολουθούν πλύσεις των μονοπύρηνων όπου τα μονοπύρηννα απαλλάσσονται από διάφορα στοιχεία όπως πρωτεΐνες ή κατάλοιπα κυτταρικών στοιχείων που προέκυψαν κατά την διαδικασία απομόνωσής τους. Μεταφέρουμε τα μονοπύρηννα που έχουν αναρροφηθεί σε καθαρό σωλήνα φυγοκέντρησης όπου και γεμίζουμε με ρυθμιστικό διάλυμα PBS . Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 1500 στροφές για 10 λεπτά.
9. Τα μονοπύρηννα σχηματίζουν ίζημα στον πυθμένα ενώ το υπερκείμενο υγρό αποβάλλεται αφήνοντας το μέγιστο 0.5 ml διαλύματος. Στη συνέχεια προσθέτουμε PBS ώστε να προκύπτει 1.5 ml διαλύματος PBS στον σωλήνα. Στη συνέχεια διαλυτοποιούμε το ίζημα προσεχτικά και το μεταφέρουμε σε

μικρούς σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου erpendorf των 1.5 ml και φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στα 300g.

10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με προσεχτικούς χειρισμούς ώστε να μην διαταραχθεί το ίζημα των κυττάρων.
11. Στο ίζημα των μονοκυττάρων για την λύση των κυττάρων προστίθενται 700μl Qiazol (trizol) και στην συνέχεια φυγοκεντρούμε για 15 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα και αφήνουμε το δείγμα να παραμείνει για μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Αποθηκεύουμε το δείγμα σε τύπου erpendorf μικροσωλήνες με καπάκι ασφαλείας και ψύχουμε στους -80°C .

5.3.4 Έκφραση mRNA της καθεψίνης B και της καθεψίνης S

Ολικό RNA απομονώθηκε από τα λευκομονοπύρρηνα κύτταρα (PBMCs) που είχαν προηγουμένως απομονωθεί απευθείας από το περιφερικό αίμα με τη χρήση φικόλης και αποθηκευτεί σε Trizol. Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρίας Zymo Research (Direct-zol RNA MiniPrep kit) το οποίο περιλαμβάνει και ένα βήμα πέψης με DNάση σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας. Για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) χρησιμοποιήθηκε 1 μικρογραμμάριο (μg) ολικού RNA και το MuLV reverse transcriptase kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας. Ακολούθως για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης των καθεψινών B και S χρησιμοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) με την χρήση Takara SYBR Premix Ex Taq (μηχάνημα StepOnePlus, Applied Biosystems). Για την καθεψίνη B και την καθεψίνη S χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές (primers): CTSB: forward: 5' - AGCGCTGGGTGGATCTAGG-3'; reverse: 5' - TTGATGGTGGGACACTGTGG-3', CTSS: forward: 5' - TCATACGATCTGGGCATGAA-3'; reverse: 5' - AGGTTCTGGGCACTGAGAGA -3', ενώ το RPLP0 εξυπηρετεί ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) (RPLP0: forward: 5' - TCGACAATGGCAGCATCTAC-3'; reverse: 5' -ATCCGTCTCCACAGACAAGG-3'). Για την σχετική έκφραση του mRNA της καθεψίνης B και της

καθεψίνης S χρησιμοποιήθηκε το μαθηματικό μοντέλο : $2^{-\Delta Ct}$, όπου $\Delta Ct = Ct$ (γονιδίου στόχου)- Ct (γονιδίου αναφοράς).

Λόγω της περιπλοκότητας και του υψηλού κόστους των συγκεκριμένων εξετάσεων, μετρήσεις CTSS διενεργήθηκαν σε μέρος του συνολικού πληθυσμού (n=98).

Σύμφωνα με τον υπολογισμό δείγματος (βλ. Στατιστική ανάλυση) ελάχιστο δείγμα 92 ατόμων ήταν επαρκές για την αναγνώριση διαφορών στην έκφραση της CTSS μεταξύ των υπο-ομάδων της διατριβής.

5.3.5 Αγγειολογικές εξετάσεις

Η λειτουργικότητα και οι μηχανικές ιδιότητες των αγγείων εκτιμήθηκαν μέσω μη – επεμβατικών τεχνικών . Αναλυτικότερα:

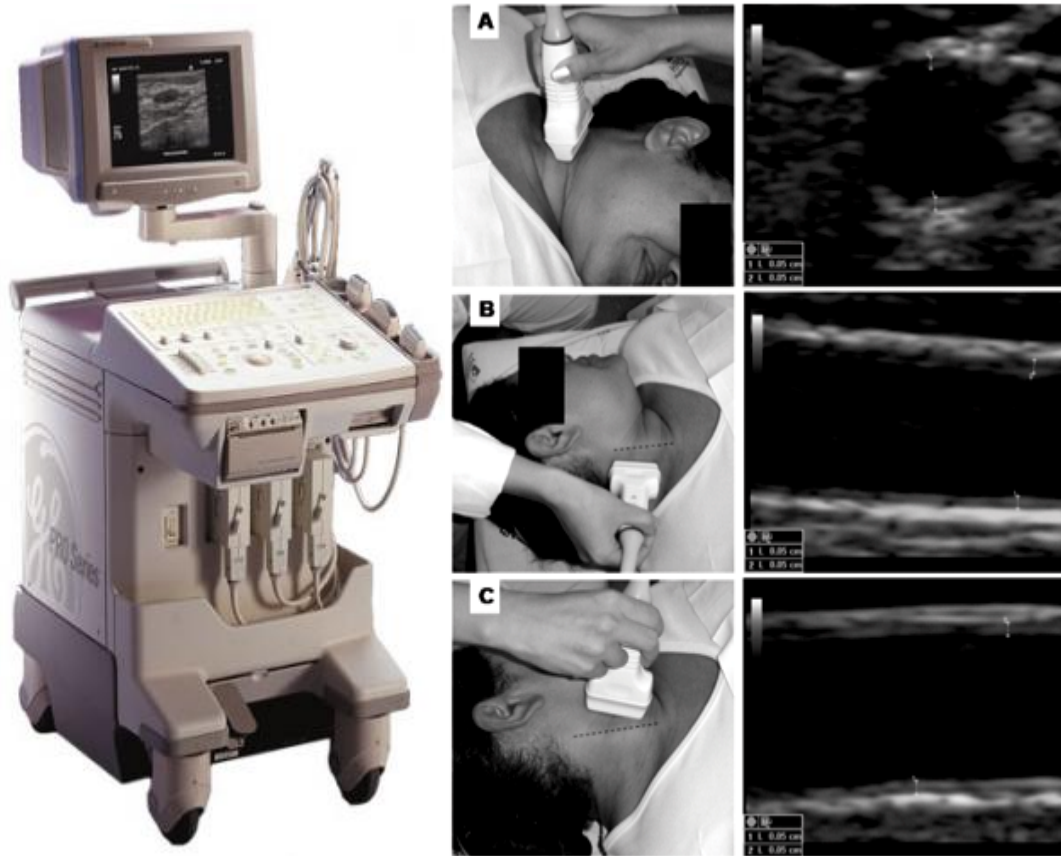
I. Μέτρηση ταχύτητας του σφυγμικού κύματος μεταξύ καρωτίδας - μηριαίας αρτηρίας (PulseWaveVelocityFemoral, PWVf) ως ένδειξη της σκληρίας (stiffness) του αρτηριακού τοιχώματος. Η ταχύτητα μετάδοσης του σφυγμικού κύματος σχετίζεται άμεσα με τη σκληρία του αρτηριακού δικτύου και όσο πιο σκληρές είναι οι αρτηρίες που διασχίζει τόσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα σφυγμικού κύματος (251,252). Μια απλή, μη επεμβατική και αξιόπιστη μέθοδος μέτρησης της σκληρίας των μεγάλων αρτηριών είναι η μέτρηση του καρωτιδο-μηριαίου PWV. Η μέτρηση της ταχύτητας του σφυγμικού κύματος γίνεται με τη βοήθεια της συσκευής Complior SP , Artech Medical, Pantin, France (Εικ. 13). Δύο αισθητήρες από πιεζοηλεκτρικό υλικό τοποθετούνται στην καρωτίδα και στη μηριαία αρτηρία και λαμβάνονται καταγραφές σφυγμικών κυμάτων ταυτόχρονα από δύο θέσεις του αρτηριακού δικτύου για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Για μεγαλύτερη ακρίβεια η απόσταση μεταξύ των δύο θέσεων , της καρωτίδας και της κοινής μηριαίας αρτηρίας υπολογίζεται με την χρήση ταινίας μέτρησης (μετροταινία) αφαιρώντας την απόσταση μεταξύ της σφαγιτιδικής εντομής και της καρωτίδας από την ολική απόσταση (253). Η τιμή του PWV υπολογίζεται ως το κλάσμα της απόστασης που έχει διανυθεί προς το χρόνο που απαιτείται για να διανύσει το σφυγμικό κύμα την εν λόγω απόσταση. Πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις και ο μέσος όρος αυτών χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση.



Εικόνα 13. Συσκευή Complior SP για μέτρηση ταχύτητας του σφυγμικού κύματος μεταξύ καρωτίδας - μηριαίας αρτηρίας (PWVf).

II. Μέτρηση του πάχους του έσω-μέσου (IMT) χιτώνα. Οι μετρήσεις λαμβάνονται με μη επεμβατική μέθοδο με τη χρήση B-mode υπερηχογραφίας (14 MHz multi-frequency linear array probe, Vivid 7 Pro, General Electric) (**Εικόνα 14**). Το IMT θεωρείται η μέγιστη απόσταση από το εγγύς όριο του έσω χιτώνα έως και το άπω όριο του μέσου χιτώνα στο άπω τοίχωμα του υπό εξέταση αρτηριακού τμήματος. Είναι ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για μελλοντικά συμβάματα του καρδιαγγειακού συστήματος και της εγκεφαλικής κυκλοφορίας (254). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και στις δύο πλευρές 3 τμημάτων του αρτηριακού δικτύου: α) κοινή καρωτίδα β) καρωτιδικός βολβός και γ) έσω καρωτίδα αρτηρία όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στη διεθνή βιβλιογραφία (255). Ο μέσος όρος των μέγιστων τιμών από τις 6 καρωτιδικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ως μέσο καρωτιδικό πάχος έσω-μέσου χιτώνα στην στατιστική ανάλυση. Όλες οι λήψεις και οι αναλύσεις

διεκπεραιώθηκαν από έναν μοναδικό χειριστή που αγνοούσε το καρδιαγγειακό προφίλ των εξεταζόμενων.



Εικόνα 14. B- mode υπερηχογραφία για τη μέτρηση του πάχους του έσω – μέσου χιτώνα των καρωτίδων (Vivid 7 Pro, General Electric).

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την αυτοματοποιημένη διάταξη μέτρησης IMT(AMS-artery measurement system). Το AMS (256) προσφέρει τη δυνατότητα ήμι-αυτοματοποιημένης λήψης πολλαπλών μετρήσεων που αυξάνουν την τελική ακρίβεια ενώ ελαχιστοποιούν την εντός και μεταξύ των χειριστών διακύμανση (intra, inter observer variability) (257). Ο έσω και μέσος χιτώνας αναγνωρίζονται σε τμήματα μήκους περίπου 1 cm στο εγγύς και άπω τοίχωμα της κοινής καρωτίδας καθώς και στο άπω τοίχωμα του καρωτιδικού βολβού και της έσω καρωτίδας. Το πρόγραμμα στη συνέχεια πραγματοποιεί κατά μέσο όρο 140 μετρήσεις για κάθε 1 cm αναγνωριζόμενου τμήματος και εξάγεται μια τελική σταθμισμένη τιμή IMT.

III. Προσδιορισμός αθηρωματικών πλακών των καρωτίδων και των μηριαίων αρτηριών.

Ο προσδιορισμός των αθηρωματικών πλακών έγινε με μη επεμβατική μέθοδο με τη χρήση B -mode υπερηχογραφίας (14 MHz multi-frequency linear array probe, Vivid 7 Pro, General Electric). Γίνεται σάρωση όλου του μήκους της καρωτίδας, της κοινής καρωτίδας, του καρωτιδικού βολβού και της έσω καρωτίδας καθώς και της κοινής μηριαίας αρτηρίας, στον επιμήκη άξονα με τις δέσμες των υπερήχων να σαρώνουν το αγγείο από την πρόσθια έως την οπίσθια γωνίωση. Ως αθηρωματικές πλάκες ορίζονται τοπικές προβολές του αρτηριακού τοιχώματος στον αγγειακό αυλό πάχους μεγαλύτερου του 0.5mm ή αυξημένου πάχους κατά 50% σε σχέση με το γειτνιάζων IMT ή πάχος του έσω μεσου χιτώνα (IMT) >1.5mm (258). Όλες οι λήψεις και οι αναλύσεις διεκπεραιώθηκαν από έναν μοναδικό χειριστή που αγνοούσε το καρδιαγγειακό προφίλ των εξεταζόμενων. Η παρουσία αθηρωματικών πλακών τόσο στην καρωτίδα (259) όσο και στις μηριαίες αρτηρίες (260) θεωρούνται ισχυροί προγνωστικοί δείκτες για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.

5.3.6 Στεφανιογραφικός έλεγχος

Η ομάδα OEM, δηλαδή τα άτομα που προσήλθαν στο Νοσοκομείο Αλεξάνδρα με εικόνα οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST διαστήματος (STEMI), χωρίς ανάσπαση του ST διαστήματος (NSTEMI) ή με ασταθή στηθάγχη υπεβλήθησαν σε στεφανιογραφικό έλεγχο. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν δόση φόρτισης με αναστολέα του P2Y2(τικαγρελόρη, πρασουγρέλη ή κλοπιδογρέλη) και ασπιρίνη σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες του εμφράγματος μυοκαρδίου (261). Η στεφανιογραφία διενεργήθηκε στο αιμοδυναμικό εργαστήριο του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα. Η προσπέλαση που χρησιμοποιήθηκε για την διενέργεια της στεφανιογραφίας ήταν δια μέσου της κερκιδικής ή της μηριαίας αρτηρίας με την χρήση της μεθόδου Seldinger και τη χρήση θηκαριού 5 ή 6 French αντίστοιχα. Σε κάθε στεφανιογραφία καταγράφηκε η ένοχη βλάβη, η θέση της βλάβης, το ποσοστό της στένωσης που προκαλεί, ο συνολικός αριθμός των αθηρωματικών πλακών του στεφανιαίου δικτύου καθώς και ο αριθμός των νοσούντων στεφανιαίων αγγείων. Στους ασθενείς που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική χορηγήθηκε άπαξ δόση ενδοφλεβίως μη κλασματοποιημένης ηπαρίνης σε δόση 70 IU/Kg. Η απόφαση για

την εμφύτευση και την επιλογή της ενδοστεφανιαίας πρόθεσης ήταν στην κρίση του επεμβατικού καρδιολόγου.

Όλοι οι ασθενείς μετά την στεφανιογραφία - αγγειοπλαστική μεταφέρθηκαν στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα.

5.3.7 Ορισμός αγγειακών δικτύων.

Η αθηροσκλήρυνση μελετήθηκε για τα εξής αγγειακά δίκτυα:

1. μηριαίες αρτηρίες (παρουσία πλακών)
2. καρωτίδες (παρουσία πλακών)
3. στεφανιαίες αρτηρίες (παρουσία πλακών που προκαλούν στένωση του αυλού του αγγείου σε ποσοστό >50%)
4. αορτή (αύξηση του PWV, όπως αυτή ορίζεται από την κατανομή του μεγαλύτερου τριτημορίου) (262,263)

5.3.8 Υπερηχοκαρδιογραφικός έλεγχος

Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη διεξήχθη σε όλους τους ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου κατά την νοσηλεία τους στην ΜΕΘ. Για τις ανάγκες της μελέτης καταγράφηκε το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας.

5.3.9 Παρακολούθηση ασθενών

Τυχαίο δείγμα πληθυσμού (100 άτομα) επανεξετάστηκαν στα 3 έτη από την πρώτη εξέταση. Έγινε εκ νέου λήψη ιστορικού, αιμοληψία για τον βασικό αιματολογικό έλεγχο και την απομόνωση των PBMCs, μέτρηση της PWV και του AI για την εκτίμηση της αρτηριακής σκληρίας και καταγραφή νέων καρδιαγγειακών συμβαμάτων μετά την αρχική εκτίμηση, το οποίο αποτελεί το σύμπλοκο τελικό σημείο της διαριβής και αφορά: θάνατο από οποιαδήποτε αιτία, θανατηφόρο ή μη οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, ανάγκη για επαναιμάτωση, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ), παροδικό ΑΕΕ, περιφερική αγγειοπάθεια, οξύ αορτικό σύνδρομο, διάγνωση νέας ή νοσηλεία για καρδιακή ανεπάρκεια, καρδιακή ανακοπή. Στον

πληθυσμό που παρακολούθηθηκε για συμβάματα προστέθηκαν και οι ασθενείς που οι ίδιοι ή οι συγγενείς τους ανταποκρίθηκαν τηλεφωνικά και συμπλήρωσαν σχετικό ερωτηματολόγιο συμβαμάτων (n=87).

5.4. Στατιστική επεξεργασία

Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση όταν ακολουθείται η κανονικότητα και ως διάμεση τιμή και ενδοτεταρτημοριακό εύρος σε αντίθετη περίπτωση. Οι κατηγορικές μεταβλητές δίνονται ως απόλυτη τιμή και ποσοστό (%). Ο έλεγχος κανονικότητας των συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε γραφικά με ιστογράμματα κατανομής και γραφήματα εκατοστημορίων (Percentile-Percentile Plots). Οι συσχετίσεις των συνεχών μεταβλητών έγιναν με την χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson ή με τον συντελεστή συσχέτισης Spearman (μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή).

Για τις συγκρίσεις συνεχών μεταβλητών μεταξύ δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε το Student's T test for 2 independent samples ή η μη παραμετρική μέθοδος Mann Whitney. Σε περίπτωση περισσότερων των δύο ομάδων, εφαρμόστηκε η ανάλυση διασποράς (ANOVA test) ή αντίστοιχα μη παραμετρική μέθοδος Kruskal Wallis για μεταβλητές χωρίς κανονική κατανομή. Σύγκριση των κατηγορικών μεταβλητών μεταξύ των ομάδων έγινε με την μη παραμετρική δοκιμασία χ^2 (chi-squared test). Σε περίπτωση πολλαπλών συγκρίσεων (>2 ομάδες) και προκειμένου να ελαχιστοποιήσουμε την πιθανότητα ψευδών θετικών αποτελεσμάτων (inflation of Type I error), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσαρμογής κατά Bonferroni.

Εν συνεχεία, εξετάσαμε τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων καθεψίνης και των εξαρτημένων μεταβλητών ενδιαφέροντος, όπως οι δείκτες υποκλινικής αθηρωμάτωσης, με τη χρήση ανάλυσης παλινδρόμησης [γραμμική παλινδρόμηση, λογιστική (logistic) παλινδρόμηση και διατάξιμη (ordinal) παλινδρόμηση]. Όλα τα πολυπαραγοντικά μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης σταθμίστηκαν για τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου (ηλικία, φύλο, συστολική αρτηριακή πίεση, την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, σακχαρώδη διαβήτη, κάπνισμα), για το GFR και την παρουσία στεφανιαίας νόσου (αναλόγως με το μοντέλο). Η επιλογή των

συγχυτικών παραγόντων (confounders) στα μοντέλα παλινδρόμησης ήταν προκαθορισμένη και βασίστηκε σε βιολογικά κριτήρια (biological plausibility). Όσον αφορά το μέγεθος δείγματος (power analysis) που αξιολογήθηκε η καθεψίνη B, η παρούσα διατριβή με 224 άτομα είχε επαρκή ισχύ (80%, με προκαθορισμένο σφάλμα τύπου I ίσο με 0.05) για την ανίχνευση μεταβολής κατά 50% στον λόγο συμπληρωματικών πιθανοτήτων (odds ratio) για αυξημένη βαρύτητα αθηρωματικής νόσου σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα καθεψίνης B. Αναφορικά με τον πληθυσμό που αξιολογήθηκε η καθεψίνη S, σύμφωνα με εκ των προτέρων υπολογισμό ισχύος (a priori), δείγμα 92 ατόμων είχε επαρκή ισχύ (80%), για την ανίχνευση διαφοράς 0.25 μονάδων για την έκφραση της καθεψίνης S μεταξύ ασθενών με στεφανιαία νόσο και υγείων μαρτύρων. Η εκτίμηση της αναμενόμενης μέσης διαφοράς βασίστηκε στη μέση τιμή της καθεψίνης S που υπολογίστηκε σε κάθε ομάδα της μελέτης από τα 10 πρώτα άτομα που συμμετείχαν σε κάθε ομάδα (υγείς: 0.55 ± 0.3 vs ΣΝ: 0.8 ± 0.5). Το σφάλμα τύπου I προκαθορίστηκε στο 0.05. Η ανάλυση ισχύος βασίστηκε στο μη παραμετρικό τεστ Wilcoxon-Mann-Whitney και πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα G*Power3.1.9.4.

Επιπρόσθετα, στα μοντέλα λογιστικής και διατάξιμης παλινδρόμησης χρησιμοποιήσαμε μια ανεξάρτητη μεταβλητή για κάθε 5 προς 10 συμβάντα της εξαρτημένης μεταβλητής για αποφυγή υπερ-προσαρμογής στα δεδομένα (model overfitting).

Το επίπεδο της προκαθορισμένης στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις αναλύσεις ήταν $p = 0.05$ ενώ όλοι οι έλεγχοι ήταν αμφίπλευροι (2-sided). Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού STATA, έκδοση 11.1 (StataCorp, College Station, Texas USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Περιγραφικά Στατιστικά Αποτελέσματα

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται τα κύρια επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της παρούσας διατριβής. Στον **πίνακα 3** παρατίθενται τα δημογραφικά και τα αγγειολογικά χαρακτηριστικά του συνολικού πληθυσμού της διατριβής, στον **πίνακα 4** τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο και στον **πίνακα 5** τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού με στεφανιαία νόσο.

Πίνακας 3. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του συνολικού πληθυσμού (n=249).

<i>Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου</i>	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	57.3 (11.3)
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	27.2 (4.87)
Φύλο [θήλυ], (%)	123 (49.4)
Καπνός, (%)	114 (46)
Αρτηριακή Υπέρταση, (%)	82 (33.1)
Υπερλιπιδαιμία, (%)	134 (54.3)
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	32 (12.9)
*Κρεατινίνη [mg/dl]	0.7 (0.29)
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη,CRP (mg/L)	0.17 (0.53)
*eGFR [ml/min]	107.9 (39.1)
Stable Cad, (%)	51 (20.5)
STEMI, (%)	26 (10.4)
NSTEMI, (%)	10 (4.02)
*CTSB, διάμεσος τιμή (25-75	0.368(0.478)

εκατοστημόριο)

*CTSS, διάμεσος τιμή (25-75 0.592(0.593)

εκατοστημόριο)

<i>Φάρμακα</i>	
Αντιαιμοπεταλιακά, (%)	31 (12.6)
Αντιλιπιδαιμικά, (%)	77 (31.2)
Αναστολείς ΣΡΑΑ, (%)	57 (23.2)
β - αποκλειστές, (%)	57 (23.1)

<i>Αγγειολογικά χαρακτηριστικά</i>	
* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος, PWV [m/s]	8.35 (1.95)
*Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	26 (11)
*Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	0.817 (0.142)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτίδων (mm)	0.820(0.255)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	0.960 (0.268)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτίδων αρτηριών(mm)	0.760 (0.220)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.650 (0.350)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στο καρωτιδικό σύστημα, (%)	99 (46.3)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	89 (41.8)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες,(%)	116 (55.5)
*Αριθμός νοσούντων αρτηριακών δικτύων	1(1)
*Αριθμός νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών	2(1)

*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25ου και 75ου εκατοστημορίου.

Πίνακας 4. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο (n=162).

<i>Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου</i>	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	54.3 (10.2)
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	27.2 (5.15)
Φύλο [θήλυ], (%)	113 (69.8)
Καπνός, (%)	72 (44.4)
Αρτηριακή Υπέρταση, (%)	32 (19.8)
Υπερλιπιδαιμία, (%)	76 (46.9)
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	8 (4.94)
*Κρεατινίνη [mg/dl],	0.6 (0.2)
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη,CRP (mg/L)	0.1 (0.174)
*eGFR [ml/min]	111.8 (31.4)
<i>Φάρμακα</i>	
Αντιαιμοπεταλιακά, (%)	1 (0.62)
Αντιλιπιδαιμικά, (%)	29 (17.9)
Αναστολείς ΣΡΑΑ, (%)	22 (13.6)
β - αποκλειστές, (%)	13 (8.02)
<i>Αγγειολογικά χαρακτηριστικά</i>	
* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος, PWV [m/s]	8.2 (1.65)
*Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	26 (11)

*Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	0.806 (0.15)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτίδων (mm)	0.78 (0.24)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	0.95 (0.28)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτίδων αρτηριών(mm)	0.76 (0.21)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.65 (0.3)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στο καρωτιδικό σύστημα,(%)	52 (33.8)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες,(%)	40 (26)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες,(%)	72 (46.8)
*Αριθμός τμημάτων καρωτίδων με αθηρ. πλάκα	0 (1)
* Αριθμός τμημάτων μηριαίων αρτηριών με αθηρ. πλάκα	0 (1)
*Αριθμός τμημάτων καρωτίδας και μηριαίων αρτηριών με αθηρ. πλάκας	0 (2)
*Αριθμός νοσούντων αρτηριακών δικτύων	1(1)

*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25ου και 75ου εκατοστημορίου.

Πίνακας 5. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του υπό εξέταση πληθυσμού με ΣΝ (n=87).

<i>Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου</i>	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	62.9 (11.24)
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	27.4 (4.24)
Φύλο [θήλυ], (%)	10 (11.49)
Καπνός, (%)	42 (48.8)
Αρτηριακή Υπέρταση, (%)	50 (58.1)
Υπερλιπιδαιμία, (%)	58 (67.4)
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	24 (27.9)
*Κρεατινίνη [mg/dl],	0.9 (0.36)
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη,CRP (mg/L)	0.61 (2.62)
*eGFR [ml/min]	84.1 (41.3)
Αριθμός ατόμων με σταθερή ΣΝ (%)/ με OEM (%)	51 (58.60)/ 36 (41.4)
Αριθμός ατόμων με STEMI (%)/ με NSTEMI (%)	26 (29.9) / 10 (11.5)
<i>Φάρμακα</i>	
Αντιαιμοπεταλιακά, (%)	30 (35.3)
Αντιλιπιδαιμικά, (%)	48 (56.5)
Αναστολείς ΣΡΑΑ, (%)	35 (41.7)
β - αποκλειστές, (%)	44 (51.8)

Αγγειολογικά χαρακτηριστικά

* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος, PWV [m/s]	9.4 (3.3)
*Δείκτης επαύξησης αρτηρ. πίεσης, AI	25 (11)
*Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	0.863 (0.09)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτίδων (mm)	0.91 (0.247)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	0.995 (0.22)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτίδων αρτηριών(mm)	0.82 (0.245)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.95 (0.2)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στο καρωτιδικό σύστημα,(%)	47 (78.3)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες,(%)	49 (83.1)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτ., (%)	44 (80)
*Αριθμός τμημάτων καρωτίδων με αθηρ. πλάκα	3 (3)
* Αριθμός τμημάτων μηριαίων αρτηριών με αθηρ. πλάκα	2 (1)
*Αριθμός τμημάτων καρωτίδας και μηριαίων αρτηριών με αθηρ. πλάκας	4 (4)
*Αριθμός νοσούντων αρτ. δικτύων	3(2)
*Αριθμός νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών	2 (1)

*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25ου και 75ου εκατοστημορίου.

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 6**) συγκρίνονται τα δημογραφικά και τα αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού χωρίς κλινικά έκδηλη στεφανιαία νόσο (ΣΝ) και του πληθυσμού με στεφανιαία νόσο (σταθερή ΣΝ και OEM). Όσον αφορά τα δημογραφικά χαρακτηριστικά ο πληθυσμός με ΣΝ ήταν μεγαλύτερος σε ηλικία (62.9 ± 11.24 πληθυσμός με ΣΝ έναντι 54.3 ± 10.2 πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p < 0.001$), αποτελούνταν κυρίως από άνδρες (88.51% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 30.2% πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p < 0.001$), είχε σε μεγαλύτερο ποσοστό αρτηριακή υπέρταση (58.1% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 19.8% πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p < 0.001$) με υψηλότερες τιμές συστολικής (διάμεση τιμή 127(IQR 31) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 120(IQR 20) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p < 0.001$) και διαστολικής αρτηριακής πίεσης (διάμεση τιμή 78 (IQR 12) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 72 (IQR 12) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p = 0.006$) σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ. Επιπλέον ο πληθυσμός με ΣΝ είχε σε μεγαλύτερο ποσοστό σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (27.9% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 4.9 % πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p < 0.001$), υψηλότερες τιμές κρεατινίνης ορού (διάμεση τιμή 0.9(IQR 0.36) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 0.6(IQR 0.2) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p < 0.001$) και κατ' επέκταση χαμηλότερο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (διάμεση τιμή 84.1(IQR 41.3) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 111.8(IQR 31.4) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p < 0.001$) σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ. Το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού με ΣΝ είχε υπερλιπιδαιμία (58% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 46.9% πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p = 0.002$) ενώ οι τιμές της LDL στον πληθυσμό με ΣΝ ήταν χαμηλότερες (διάμεση τιμή 98.5 (IQR 47) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 127 (IQR 48) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p < 0.001$) σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών ελάμβανε αντιλιπιδαιμική αγωγή (56.5% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 17.9 % πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p < 0.001$) . Οι ασθενείς με ΣΝ είχαν υψηλότερες τιμές CRP (διάμεση τιμή 0.61 (IQR 2.62) σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς ΣΝ (διάμεση τιμή 0.1(IQR 0.174) $p < 0.001$).

Όσον αφορά τα αγγειολογικά χαρακτηριστικά παρατηρούμε ότι οι ασθενείς με ΣΝ είχαν χαρακτηριστικά υψηλότερη επίπτωση υποκλινικής αθηρωμάτωσης σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ καθώς είχαν υψηλότερες τιμές ταχύτητας σφυγμικού κύματος (διάμεση τιμή 9.4 (IQR 3.3) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή

8.2(IQR 1.65) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$) και υψηλότερο αθηρωματικό φορτίο καθώς είχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό αθηρωματικές πλάκες στο καρωτιδικό σύστημα (78.3% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 33.8% πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$), στις μηριαίες αρτηρίες (83.1% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 26% πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$) αλλά και στα δύο αρτηριακά δίκτυα μαζί (80% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 46.8% πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$). Επιπλέον ο πληθυσμός με ΣΝ είχε μεγαλύτερο αριθμό τμημάτων του καρωτιδικού συστήματος με αθηρωματικές πλάκες (διάμεση τιμή 3(IQR 3) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 0(IQR 1) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$), μεγαλύτερο αριθμό τμημάτων μηριαίων αρτηριών με αθηρωματικές πλάκες (διάμεση τιμή 2 (IQR 1) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 0(IQR 1) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$) και μεγαλύτερο αριθμό νοσούντων αρτηριακών δικτύων (διάμεση τιμή 3(IQR2) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 1 (IQR1) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$) σε σύγκριση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ. Αναφορικά με την φαρμακευτική αγωγή του πληθυσμού κατά την λήψη ιστορικού, ο πληθυσμός με ΣΝ ελάμβανε σε μεγαλύτερο ποσοστό αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (35.3% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 0.62% πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$), αναστολείς του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης- αλδοστερόνης (ΣΡΑΑ) (41.7% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 13.6% πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$), β αποκλειστές (51.8% πληθυσμός με ΣΝ έναντι 8.02% πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$) και υπολιπιδαιμική αγωγή, όπως προαναφέρθηκε, σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ. Σχετικά με την κατανομή των τιμών της έκφρασης των καθεψινών CTSB και CTSS στις δύο ομάδες ο πληθυσμός με ΣΝ είχε υψηλότερες τιμές έκφρασης της CTSB (διάμεση τιμή 0.479 (IQR 0.876) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 0.300 (IQR 0.369) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p=0.006$) και της CTSS (διάμεση τιμή 0.881 (IQR 0.460) πληθυσμός με ΣΝ έναντι διάμεση τιμή 0.460 (IQR 0.449) πληθυσμού χωρίς ΣΝ, $p<0.001$) (**Εικόνα 15**) σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ, ενώ οι υποομάδες του πληθυσμού με ΣΝ (σταθερή ΣΝ και OEM) δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές τόσο στις τιμές έκφρασης της καθεψίνης B ($p=0.154$) όσο και της καθεψίνης S ($p=0.174$) (**Εικόνα 16**). Αναφορικά με την σύγκριση των υποομάδων με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ, τα επίπεδα της CTSB ($p=0.007$) και της CTSS ($p<0.001$) βρέθηκαν σημαντικά πιο ψηλά στον πληθυσμό με OEM σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ, ενώ μόνο τα επίπεδα της CTSS (

p=0.036), και όχι της CTSB (p=0.09), διέφεραν σημαντικά μεταξύ του πληθυσμού με σταθερή ΣΝ και του πληθυσμού χωρίς ΣΝ (Εικόνα 16).

Πίνακας 6. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του υπό εξέταση πληθυσμού σε ομάδες. (n=249).

	Πληθυσμός χωρίς ΣΝ	Πληθυσμός με ΣΝ	**Στατιστική σημαντικότητα (P-value)
N	162	87	
<i>Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου</i>			
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	54.3 (10.2)	62.9 (11.24)	<0.001
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	27.2 (5.15)	27.4 (4.24)	0.769
Φύλο [θήλυ], n (%)	113 (69.8)	10 (11.49)	<0.001
Καπνός, n (%)	72 (44.4)	42 (48.8)	0.509
Αρτηριακή Υπέρταση, n (%)	32 (19.8)	50 (58.1)	<0.001
*SBP [mmHg], διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	120 (20)	127 (31)	<0.001
*DBP [mmHg], διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	72 (12)	78 (12)	0.006
Υπερλιπιδαιμία, n (%)	76 (46.9)	58 (67.4)	0.002
*Ολική χοληστερόλη [mg/dl], διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	212.7 (60.4)	181 (49.8)	<0.001

*LDL [mg/dl], διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	127 (48)	98.5 (47)	<0.001
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	8 (4.94)	24 (27.9)	<0.001
*Κρεατινίνη [mg/dl], διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	0.6 (0.2)	0.9 (0.36)	<0.001
*CRP(mg/L), διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	0.1(0.174)	0.61(2.62)	<0.001
*eGFR [ml/min], διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	111.8 (31.4)	84.1 (41.3)	<0.001
*CTSB, διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	0.300 (0.369)	0.479 (0.876)	0.006
*CTSS, διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	0.460 (0.449)	0.881 (0.460)	<0.001

Φάρμακα

Αντιαιμοπεταλιακά, n (%)	1 (0.62)	30 (35.3)	<0.001
Αντιλιπιδαιμικά, n (%)	29 (17.9)	48 (56.5)	<0.001
Αναστολείς ΣΡΑΑ, n (%)	22 (13.6)	35 (41.7)	<0.001
β - αποκλειστές, n (%)	13 (8.02)	44 (51.8)	<0.001

Αγγειολογικά χαρακτηριστικά

* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος, PWV [m/s], διάμεσος τιμή (25-75 εκατοστημόριο)	8.2 (1.65)	9.4 (3.3)	<0.001
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στο καρωτιδικό	52 (33.8)	47 (78.3)	<0.001

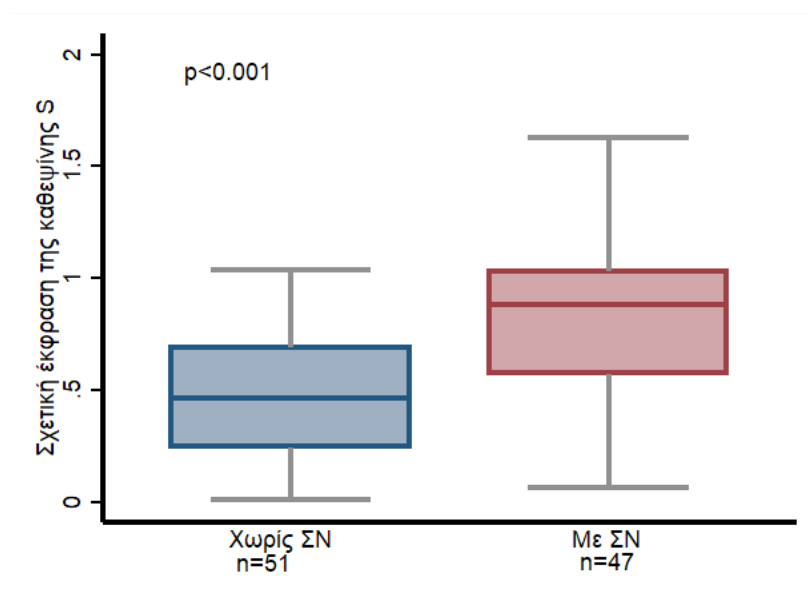
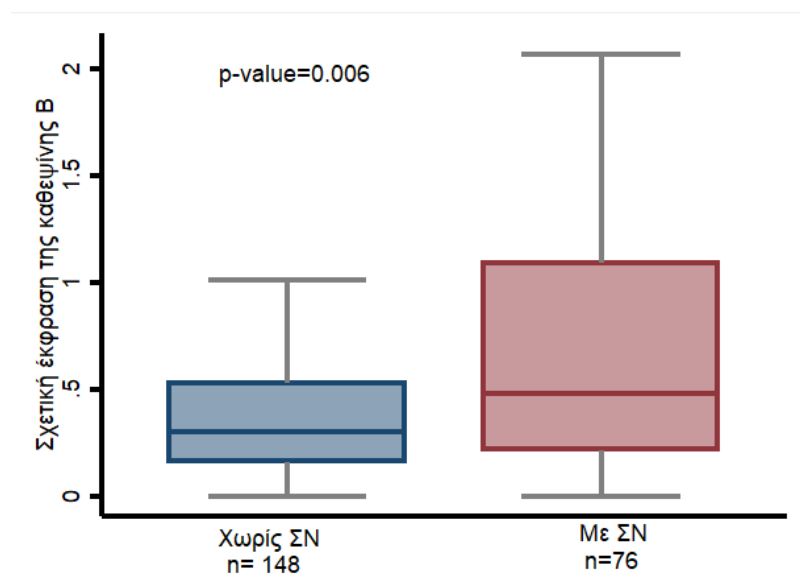
σύστημα, n (%)

Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, n (%)	40 (26)	49 (83.1)	<0.001
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες, n (%)	72 (46.8)	40 (80)	<0.001
*Αριθμός τμημάτων καρωτίδων με αθηρ. πλάκα	0 (1)	3 (3)	<0.001
* Αριθμός τμημάτων μηριαίων αρτηριών με αθηρ. πλάκα	0 (1)	2 (1)	<0.001
*Αριθμός τμημάτων καρωτίδας και μηριαίων αρτηριών με αθηρ. πλάκας	0 (2)	4 (4)	<0.001
*Αριθμός νοσούντων αρτηριακών δικτύων	1(1)	3(2)	<0.001

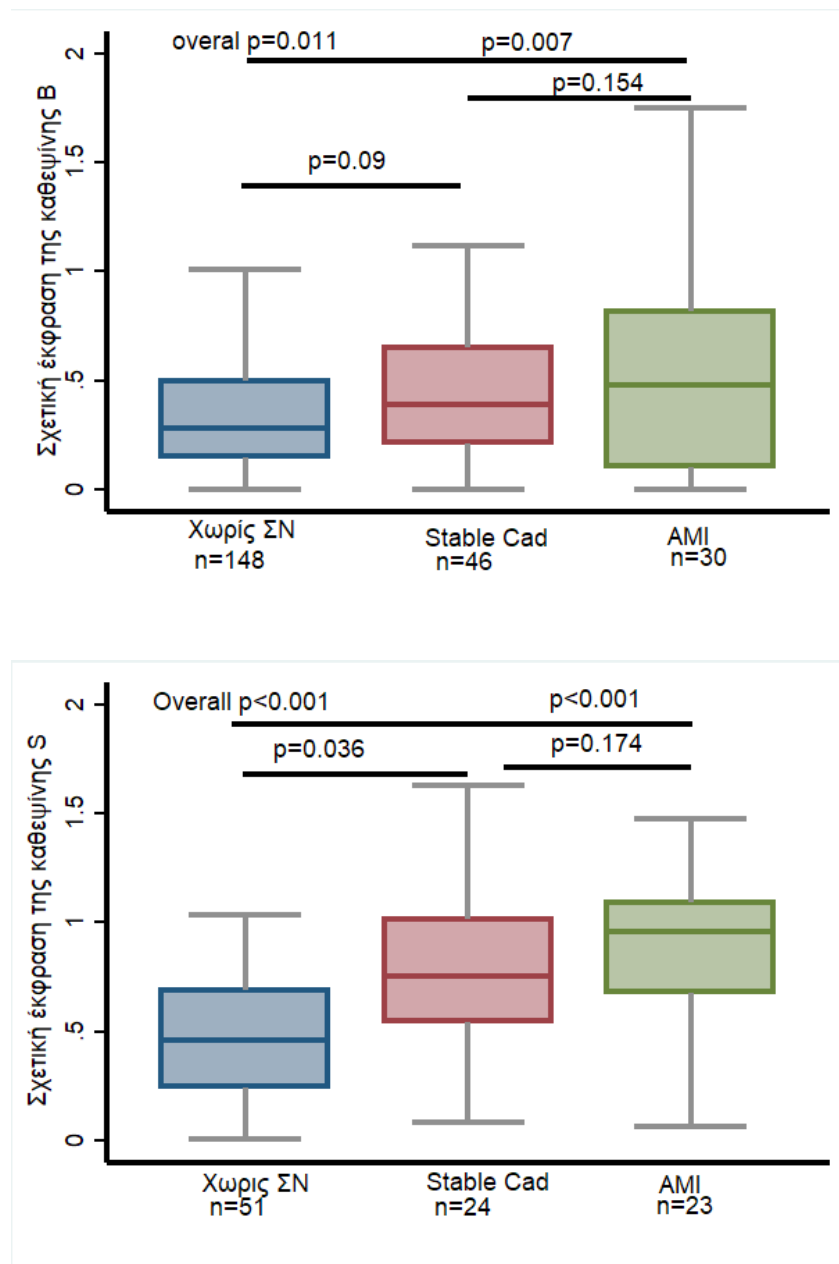
*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών(IQR) μεταξύ 25^{ου} και 75^{ου} εκατοστημορίου.

** Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από το ANOVA τεστ ή το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis ή chi-square τεστ

Εικόνα 15 . Σύγκριση της αναλογίας της έκφρασης της καθεψίνης B και της καθεψίνης S ανάμεσα στον πληθυσμό χωρίς ΣΝ και στον πληθυσμό με ΣΝ. Η έκφραση της καθεψίνης B και της καθεψίνης S αυξάνεται σημαντικά στον πληθυσμό με ΣΝ συγκριτικά με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ . Αυτή η διαφορά φαίνεται να είναι στατιστικώς ακόμα πιο σημαντική στην καθεψίνη S ($p < 0.001$) σε σχέση με την καθεψίνη B ($p = 0.006$). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis.



Εικόνα 16. Σύγκριση της αναλογίας της έκφρασης της καθεψίνης Β και της καθεψίνης S ανάμεσα στον πληθυσμό χωρίς ΣΝ, στον πληθυσμό με σταθερή ΣΝ και στον πληθυσμό με OEM. Αυξημένα επίπεδα και των δύο καθεψινών παρατηρήθηκαν στην υποομάδα με OEM σε σχέση με την ομάδα χωρίς ΣΝ, ενώ μόνο τα επίπεδα της CTSS βρέθηκαν σημαντικά πιο υψηλά στην υποομάδα με σταθερή ΣΝ σε σύγκριση με την ομάδα χωρίς ΣΝ. Οι δύο υποομάδες μεταξύ τους δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά ως προς τα επίπεδα και των δύο καθεψινών. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν της συγκρίσεις των ζευγαριών ανάμεσα στις κατηγορίες ενδιαφέροντος.



6.2 Μονοπαραγοντικές συσχετίσεις

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται οι συσχετίσεις των δημογραφικών και αγγειολογικών χαρακτηριστικών του πληθυσμού σε ομάδες με την έκφραση της καθεψίνης B και την έκφραση της καθεψίνης S των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs) όπως αυτή κατανεμήθηκε σε ανώτερο και κατώτερα τριτημόρια.

Συνολικός πληθυσμός

Έκφραση της καθεψίνης B και της καθεψίνης S όπως αυτή κατανεμήθηκε σε τριτημόρια στον συνολικό πληθυσμό.

Στον **πίνακα 7** παρατίθενται τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης B των PBMCs σε ανώτερο και κατώτερα τριτημόρια. Ο πληθυσμός που κατανεμήθηκε στο ανώτερο τριτημόριο έκφρασης της καθεψίνης B ήταν μεγαλύτερος σε ηλικία (56.4 ± 11.1 στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 59.9 ± 11.8 στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.039$), έκανε σε μεγαλύτερο ποσοστό χρήση καπνού (38.93% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 53.42% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.041$), παρουσίαζε σε υψηλότερο ποσοστό αρτηριακή υπέρταση (25.5% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 43.8% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.0058$) και υπερλιπιδαιμία (35.57% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 58.9% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.001$) και είχε υψηλότερες τιμές κρεατινίνης ορού (διάμεση τιμή 0.7 (IQR 0.2) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 0.8 (IQR 0.46) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.005$) σε σχέση με τον πληθυσμό των κατωτέρων τριτημορίων. Η έκφραση της καθεψίνης B συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης (eGFR) ($r=-0.155$, $p=0.021$). Επιπλέον αυξημένες τιμές C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) παρατηρήθηκαν στον πληθυσμό στο ανώτερο τριτημόριο ($r=-0.230$, $p=0.001$) σε σχέση με τον πληθυσμό στα κατώτερα τριτημόρια (**Εικόνα 17**).

Αναφορικά με τα αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού που μετρήθηκε η έκφραση της καθεψίνης B των PBMCs και την κατανομή της σε τριτημόρια παρατηρήθηκε αυξημένη επίπτωση αθηρωμάτωσης στον πληθυσμό του ανώτερου

τριτημόριου της καθεψίνης B, καθώς ο πληθυσμός στο ανώτερο τριτημόριο της καθεψίνης B συσχετίστηκε με τη παρουσία αθηρωματικών πλακών στο καρωτιδικό σύστημα (38.46% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 55.56% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.025$) και στις μηριαίες αρτηρίες (35.66% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 50.79% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.045$) και με αυξημένο αριθμό νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών (διάμεση τιμή 0 (IQR 1) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 2 (IQR 0) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.012$) και νοσούντων αρτηριακών δικτύων (διάμεση τιμή 1 (IQR 2) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 1 (IQR 2) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.002$) σε σχέση με τα κατώτερα τριτημόρια. Στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς το πάχος του έσω μέσου χιτώνα δεν παρατηρήθηκε κατά την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης B.

Στον **πίνακα 8** παρατίθενται τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του συνολικού πληθυσμού σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης S σε ανώτερο και κατώτερα τριτημόρια. Ο πληθυσμός που κατανεμήθηκε στο ανώτερο τριτημόριο της έκφρασης της καθεψίνης S είχε μεγαλύτερη ηλικία (55.1 ± 11 στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 63.4 ± 13.1 στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.001$), παρουσίαζε σε υψηλότερο ποσοστό αρτηριακή υπέρταση (30.8% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 59.4% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.007$) και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (7.69% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 28.1% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.007$) ενώ είχε υψηλότερες τιμές κρεατινίνης (διάμεση τιμή 0.7 (IQR 0.2) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 0.84 (IQR 0.43) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.002$) και χαμηλότερο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (διάμεση τιμή 108.4 (IQR 31.1) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 94.6 (IQR 49.8) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.002$) σε σχέση με τον πληθυσμό που κατανεμήθηκε στα κατώτερα τριτημόρια της έκφρασης της καθεψίνης S. Ο πληθυσμός στο ανώτερο τριτημόριο παρουσίαζε έντονη φλεγμονώδη αντίδραση με υψηλότερες τιμές C- αντιδρώσας πρωτεΐνης ($r=-0.383$, $p<0.001$) σε σχέση με τον πληθυσμό στα κατώτερα τριτημόρια (**Εικόνα 17**). Όσον αφορά τα αγγειολογικά χαρακτηριστικά η κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης S στο ανώτερο τριτημόριο συσχετίστηκε με υψηλότερους δείκτες υποκλινικής αθηρωμάτωσης και υψηλότερο αθηρωματικό φορτίο καθώς είχε υψηλότερες τιμές ταχύτητας σφυγμικού κύματος (διάμεση τιμή 8.55 (IQR 1.95) στα

κατώτερα τριτημόρια έναντι 9.58 (IQR 3.25) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.014$) και μεγαλύτερα ποσοστά αθηρωματικών πλακών τόσο στις καρωτίδες (50% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 75% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.037$) και στις μηριαίες αρτηρίες (44.8% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 70.8% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.032$) όσο και στα δύο αυτά δίκτυα μαζί (58.6% στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 82.6% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.041$).

Εκτός από τα περιφερικά αγγεία ο πληθυσμός στο ανώτερο τριτημόριο έκφρασης της καθεψίνης S είχε μεγαλύτερο αριθμό νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών (διάμεση τιμή 1 (IQR 1) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 2 (IQR 2) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.018$), και επομένως και μεγαλύτερο αριθμό αρτηριακών δικτύων (διάμεση τιμή 1 (IQR 0.2) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 3 (IQR 3) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.011$) σε σχέση με τον πληθυσμό στα κατώτερα τριτημόρια της έκφρασης της καθεψίνης S.

Πίνακας 7. Δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του συνολικού πληθυσμού σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεσίνης Β (CTSB) σε τριτημόρια.

	Συνολικά	Κατώτερα τριτημόρια CTSB	Ανώτερο τριτημόριο CTSB	**Στατιστική σημαντικότητα (P-value)
N	224	150	74	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	57.6(11.4)	56.4(11.1)	59.9(11.8)	0.039
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	27.2(4.9)	27.3(5.02)	27.1(4.68)	0.791
Φύλο [Θήλυ], (%)	108(48.43)	66(44.00)	42(57.53)	0.058
Κάπνος, (%)	97(43.69)	58(38.93)	39(53.42)	0.041
Συστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	133(21.6)	135(22.2)	129(20.3)	0.301
Διαστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	75.9(10.2)	76.3(11.1)	75.4(8.45)	0.703
Αρτηριακή Υπέρταση, (%)	70(31.53)	38(25.50)	32(43.84)	0.0058
Υπερλιπιδαιμία, (%)	96(43.24)	53(35.57)	43(58.90)	0.001
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	32(14.41)	18(12.08)	14(19.18)	0.157
*Κρεατινίνη [mg/dl]	0.7(0.20)	0.7(0.2)	0.8(0.46)	0.005
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη,CRP (mg/L)	0.17(0.5)	0.12(0.3)	0.23(0.76)	0.002
*eGFR [ml/min]	108(41.11)	111(42.1)	104(53.9)	0.006

<i>Φάρμακα</i>				
Αντιαιμοπεταλιακά, n (%)	30(13.64)	18(12.08)	12(16.90)	0.330
Αντιλιπιδαιμικά, n (%)	70(31.82)	45(30.41)	25(34.72)	0.519
Αναστολείς ΣΡΑΑ, n (%)	49(22.27)	30(20.27)	19(26.39)	0.306
β - αποκλειστές, n (%)	52(23.53)	31(20.81)	21(29.17)	0.170
<i>Αγγειολογικά χαρακτηριστικά</i>				
*Ταχύτητα σφυγμικού κύματος PWV [m/s]	8.35(1.94)	8.2(1.85)	8.95(2.1)	0.084
* PWV highest tertile	51(31.68)	31(28.18)	20(39.22)	0.162
*Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	26(12)	27(6)	20.5(10)	0.190
*Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	0.86(0.11)	0.86(0.11)	0.86(0.11)	0.692
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτίδων (mm)	0.93(0.26)	0.94(0.31)	0.9(0.14)	0.446
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	1(0.24)	0.97(0.26)	1.04(0.23)	0.727
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτίδων αρτηριών(mm)	0.79(0.29)	0.78(0.24)	0.87(0.29)	0.664
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.97(0.17)	0.95(0.15)	1(0.2)	0.655
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες, (%)	85(44.04)	50(38.46)	35(55.56)	0.025
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	78(40.63)	46(35.66)	32(50.79)	0.045
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	101(53.72)	64(49.61)	37(62.71)	0.095
*Αριθμός νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών	0(1)	0(1)	0(2)	0.012

*Αριθμός νοσούντων αρτηριακών δικτύων	1(2)	1(2)	1(2)	0.002
---------------------------------------	------	------	------	--------------

*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25^{ου} και 75^{ου} εκατοστημορίου.

** Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από το ANOVA τεστ ή το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis ή chi-square τεστ

Πίνακας 8. Δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του συνολικού πληθυσμού σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης S (CTSS) σε τριτημόρια.

	Συνολικά	Κατώτερα τριτημόρια CTSS	Ανώτερο τριτημόριο CTSS	**Στατιστική σημαντικότητα (P-value)
N	98	66	32	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	57.8(12.3)	55.1(11)	63.4(13.1)	0.001
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	26.5(4.29)	26.5(4.34)	26.7(4.25)	0.776
Φύλο [Θήλυ], (%)	40 (40.8)	31 (47)	9 (28.1)	0.075
Κάπνος, (%)	57 (58.8)	39 (60)	18 (56.3)	0.724
Συστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	127.0 (18.7)	125.2 (16.9)	130.7 (21.8)	0.180
Διαστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	74.9 (9.48)	75.1 (9.35)	74.3 (9.87)	0.694
Αρτηριακή Υπέρταση, (%)	39 (40.2)	20 (30.8)	19 (59.4)	0.007
Υπερλιπιδαιμία, (%)	59 (60.8)	38 (56.5)	21 (65.6)	0.497
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	14 (14.4)	5 (7.69)	9 (28.1)	0.007
*Κρεατινίνη [mg/dl]	0.8 (0.4)	0.7 (0.2)	0.84 (0.43)	0.002
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη,CRP (mg/L)	0.209 (0.72)	0.18 (0.56)	0.72 (3.22)	0.001
*eGFR [ml/min]	105.2 (43.4)	108.4 (31.1)	94.6 (49.8)	0.002
Φάρμακα				
Αντιαιμοπεταλιακά, n (%)	15 (15.6)	8 (12.3)	7 (22.6)	0.195
Αντλιπιδαιμικά, n (%)	29 (30.2)	16 (24.6)	13 (41.9)	0.084
Αναστολείς ΣΡΑΑ, n (%)	24 (25)	14 (21.5)	10 (32.3)	0.257

β - αποκλειστές, n (%)	26 (27.1)	12 (18.5)	14 (45.2)	0.006
------------------------	-----------	-----------	-----------	--------------

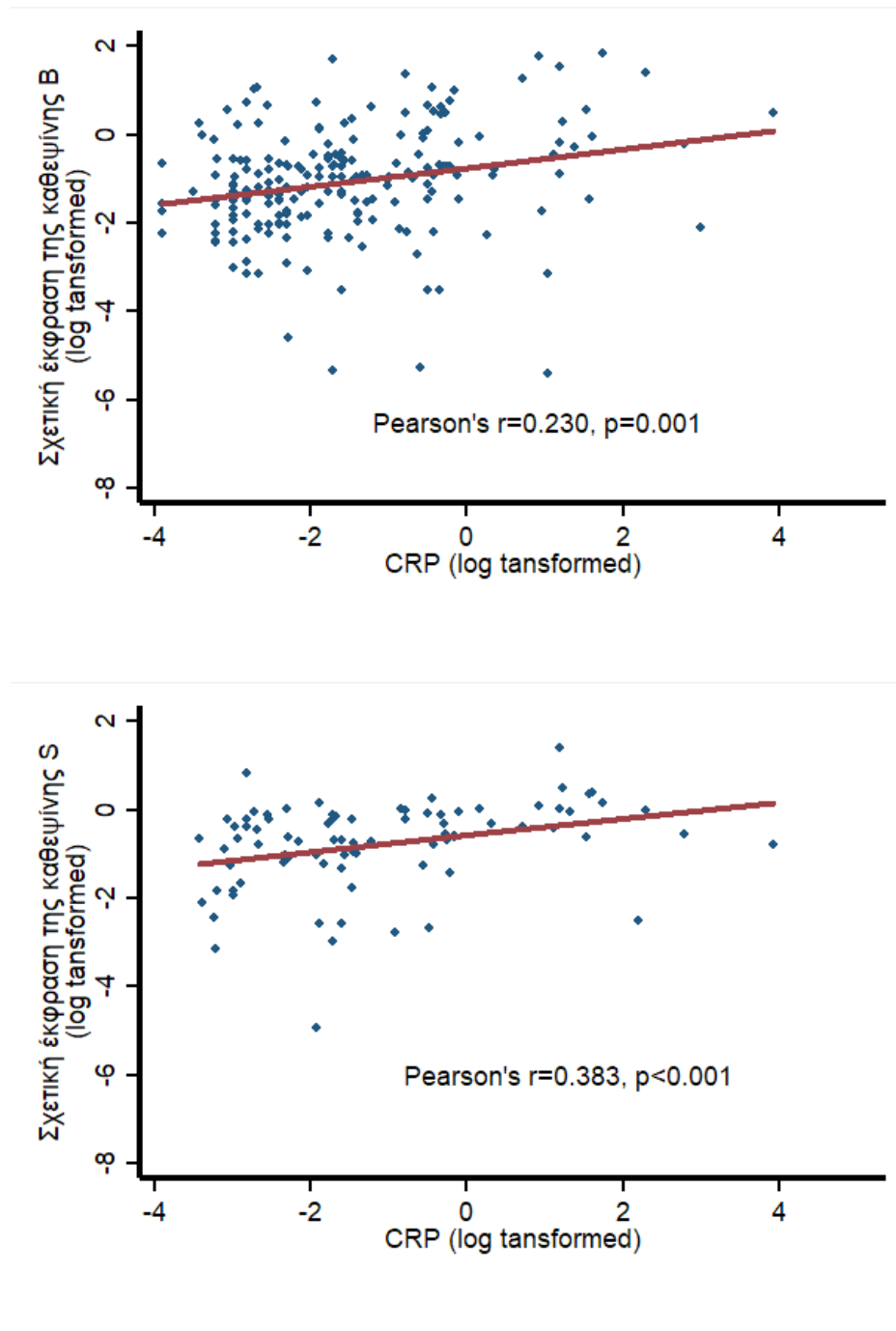
Αγγειολογικά χαρακτηριστικά

*Ταχύτητα σφυγμικού κύματος PWV [m/s]	8.95 (1.95)	8.55 (1.95)	9.58 (3.25)	0.014
* PWV highest tertile	26 (33.3)	15 (26.8)	11 (50)	0.050
*Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	25 (12)	26 (11)	22 (13)	0.107
*Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	0.837 (0.173)	0.837 (0.158)	0.842 (0.767)	0.795
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτίδων (mm)	0.84 (0.2)	0.828 (0.2)	0.9 (0.14)	0.179
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	0.96 (0.27)	0.935 (0.325)	0.995 (0.23)	0.656
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτίδων αρτηριών(mm)	0.77 (0.233)	0.77 (0.24)	0.768 (0.238)	0.770
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.775 (0.425)	0.775 (0.35)	0.75 (0.6)	0.970
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες, (%)	47 (57.3)	29 (50)	18 (75)	0.037
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	43 (52.4)	26 (44.8)	17 (70.8)	0.032
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	53 (65.4)	34 (58.6)	19 (82.6)	0.041
*Αριθμός νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών	2 (2)	1 (1)	2 (2)	0.018
*Αριθμός νοσούντων αρτηριακών δικτύων	2 (2)	1 (2)	3 (3)	0.011

*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25^{ov} και 75^{ov} εκατοστημορίου.

** Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από το ANOVA τεστ ή το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis ή chi-square τεστ

Εικόνα 17. Στα διαγράμματα διασποράς παρακάτω φαίνονται ξεχωριστά οι συσχετίσεις της καθεψίνης B και τη καθεψίνης S με την C - αντιδρώσα πρωτεΐνη . Στο συνολικό πληθυσμό και οι δύο καθεψίνες έχουν γραμμική συσχέτιση με την CRP, με την καθεψίνη S να συσχετίζεται πιο ισχυρά. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από την χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson.



Πληθυσμός χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο.

Έκφραση της καθεψίνης B και της καθεψίνης S όπως αυτή κατανεμήθηκε σε τριτημόρια στον πληθυσμό χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο .

Στον **πίνακα 9** παρατίθενται τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης B σε ανώτερο και κατώτερα τριτημόρια. Ο πληθυσμός στο ανώτερο τριτημόριο της έκφρασης της καθεψίνης B παρουσίαζε υψηλότερη επίπτωση υπερλιπιδαιμίας σε σχέση με τον πληθυσμό στα κατώτερα τριτημόρια (23.23 % στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 54.17% στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.002$). Όσο αφορά τις αγγειολογικές μετρήσεις δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στον πληθυσμό στο ανώτερο και στα κατώτερα τριτημόρια της έκφρασης της καθεψίνης B. Στον **πίνακα 10** παρατίθενται τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης S σε ανώτερο και κατώτερα τριτημόρια . Τόσο στα δημογραφικά όσο και στα αγγειολογικά χαρακτηριστικά δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης S σε τριτημόρια σε αυτόν τον πληθυσμό.

Πίνακας 9. Δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού χωρίς κλινικά έκδηλη ΣΝ σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης B (CTSB) σε τριτημόρια.

	Συνολικά	Κατώτερα τριτημόρια CTSB	Ανώτερο τριτημόριο CTSB	**Στατιστική σημαντικότητα (P-value)
N	148	99	49	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	54.4(10.3)	54.4(10.3)	54.3(10.2)	0.95
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	27.1(5.24)	27.2(5.27)	27(5.22)	0.846
Φύλο [θήλυ], n (%)	42(28.57)	28(28.28)	14(29.17)	0.911
Καπνός, n (%)	61(41.50)	37(37.37)	24(50)	0.145
Συστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	123(14.9)	123(15.4)	123(14)	0.903
Διαστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	73.3(9.5)	73.5(9.16)	74.2(10.2)	0.705
Αρτηριακή Υπέρταση, n (%)	27(18.37)	15(15.15)	12(25.00)	0.148
Υπερλιπιδαιμία, n (%)	49(33.33)	23(23.23)	26(54.17)	0.002
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	9(6.12)	8(8.08)	1(2.08)	0.155
*Κρεατινίνη [mg/dl]	0.6(0.2)	0.6(0.2)	0.6(0.2)	0.259
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη,CRP (mg/L)	0.1(0.17)	0.1(0.19)	0.21(0.65)	0.084
*eGFR [ml/min]	114(32.88)	112(36.5)	123(31.3)	0.301
Φάρμακα				

Αντιαιμοπεταλιακά, (%)	1(0.68)	0(0.00)	1(2.08)	0.15
Αντιλιπιδαιμικά, (%)	26(17.69)	15(15.15)	11(22.92)	0.247
Αναστολείς ΣΡΑΑ, (%)	19(12.93)	11(11.11)	8(16.67)	0.346
3 - αποκλειστές, (%)	11(7.48)	6(6.06)	5(10.42)	0.347
<i>Αγγειολογικά χαρακτηριστικά</i>				
* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος PWV [m/s]	8.2(1.79)	8.18(1.82)	8.45(1.65)	0.51
* PWV highest tertile	42(32.06)	25(28.41)	17(39.53)	0.2
* Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	26(11)	26(10)	25(14)	0.837
* Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	0.79(0.15)	0.79(0.17)	0.8(0.17)	0.822
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτιδών (mm)	0.76(0.21)	0.74(0.24)	0.8(0.19)	0.18
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	0.91(0.27)	0.92(0.28)	0.88(0.26)	0.699
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτιδών αρτηριών(mm)	0.72(0.2)	0.72(0.19)	0.75(0.25)	0.934
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.65(0.35)	0.65(0.3)	0.6(0.45)	0.728
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες, (%)	44(31.65)	28(30.43)	16(34.04)	0.665
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	34(24.46)	22(23.91)	12(25.53)	0.834
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	63(45.32)	40(43.48)	23(48.94)	0.541
*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25 ^{ου} και 75 ^{ου} εκατοστημορίου.				
** Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από το ANOVA τεστ ή το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis ή chi-square τεστ				

Πίνακας 10. Δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού χωρίς κλινικά έκδηλη ΣΝ σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης S (CTSS) σε τριτημόρια.

	Συνολικά	Κατώτερα τριτημόρια CTSS	Ανώτερο τριτημόριο CTSS	**Στατιστική σημαντικότητα (P-value)
N	51	34	17	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	53.1(11.4)	53.7(9.82)	51.8(14.2)	0.565
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	26.4(4.41)	26.4(4.23)	26.3(4.87)	0.930
Φύλο [θήλυ], n (%)	36 (70.6)	24 (70.6)	12 (70.6)	0.999
Καπνός, n (%)	31 (60.8)	20 (28.8)	11 (64.7)	0.685
Συστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	121.9 (12.3)	120.9 (12.8)	123.7 (11.4)	0.456
Διαστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	72.8 (8.38)	72.2 (7.42)	74.1 (10.2)	0.448
Αρτηριακή Υπέρταση, n (%)	12 (23.5)	8 (23.5)	4 (23.5)	0.999
Υπερλιπιδαιμία, n (%)	27 (52.9)	18 (52.9)	9 (52.9)	0.999
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
*Κρεατινίνη [mg/dl]	0.6 (0.2)	0.6 (0.2)	0.6 (0.3)	0.920
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη,CRP (mg/L)	0.131 (0.177)	0.148 (0.18)	0.79 (0.27)	0.759
*eGFR [ml/min]	112.5 (28.2)	112.5 (26.8)	108.0 (33.1)	0.968

<i>Φάρμακα</i>				
Αντιαιμοπεταλιακά, (%)	1 (1.96)	0 (0)	1 (5.88)	0.153
Αντιλιπιδαιμικά, (%)	7 (13.7)	4 (11.8)	3 (17.7)	0.331
Αναστολείς ΣΡΑΑ, (%)	6 (11.8)	4 (11.8)	2 (11.8)	0.999
3 - αποκλειστές, (%)	6 (11.8)	4 (11.8)	2 (11.8)	0.999
<i>Αγγειολογικά χαρακτηριστικά</i>				
* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος PWV [m/s]	8.35 (1.7)	8.35 (1.15)	8.95 (2.55)	0.690
* PWV highest tertile	16 (32)	8 (24.2)	8 (47.1)	0.101
* Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	25.5 (13)	26 (11)	23 (13)	0.436
* Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	0.832 (0.173)	0.838 (0.16)	0.819 (0.156)	0.206
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτίδων (mm)	0.82 (0.2)	0.82 (0.17)	0.8 (0.2)	0.339
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	0.953 (0.285)	0.955 (0.335)	0.95 (0.25)	0.851
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτίδων αρτηριών(mm)	0.77 (0.22)	0.8 (0.225)	0.73 (0.240)	0.286
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.7 (0.4)	0.75 (0.35)	0.6 (0.5)	0.234
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες, (%)	19 (8)	12 (36.4)	7 (41.2)	0.740
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	15 (30)	10 (30.3)	5 (29.4)	0.948
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	26 (52)	16 (48.5)	10 (58.8)	0.488

*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25^{ου} και 75^{ου} εκατοστημορίου.

** Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από το ANOVA τεστ ή το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis ή chi-square τεστ

Πληθυσμός με στεφανιαία νόσο

Έκφραση της καθεψίνης B και της καθεψίνης S όπως αυτή κατανεμήθηκε σε τριτημόρια στον πληθυσμό με στεφανιαία νόσο.

Στον **πίνακα 11** παρατίθενται τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού με στεφανιαία νόσο σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης B σε ανώτερο και κατώτερα τριτημόρια. Ο πληθυσμός στο ανώτερο τριτημόριο παρουσίασε υψηλότερες τιμές κρεατινίνης ορού σε σχέση με τον πληθυσμό στα κατώτερα τριτημόρια (διάμεση τιμή 0.9(IQR 0.3) μονάδες σχετικής έκφρασης, στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 1.13(IQR 0.67) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.028$) ενώ συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με τις τιμές σπειραματικής διήθησης (eGFR) (διάμεση τιμή 90.3 (IQR 42.5) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 68.3(IQR 59.2) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.018$). Επιπλέον στον πληθυσμό στο ανώτερο τριτημόριο παρατηρήθηκε έντονη φλεγμονώδη αντίδραση σε σχέση με τα κατώτερα τριτημόρια, καθώς είχαν υψηλότερες τιμές C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) (διάμεση τιμή 0.54 (IQR 1.27) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 0.91(IQR 2.68) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.012$).

Ο πληθυσμός στο ανώτερο τριτημόριο συσχετίστηκε με επηρεασμένη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας, καθώς το κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας βρέθηκε χαμηλότερο σε αυτόν τον πληθυσμό σε σχέση με τον πληθυσμό στα κατώτερα τριτημόρια (διάμεση τιμή 50(IQR 11.5) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 45(IQR 16) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.015$). Επιπλέον ο πληθυσμός με ΣΝ στο ανώτερο τριτημόριο έκφρασης της καθεψίνης B φαίνεται να είχε σε μεγαλύτερο ποσοστό πολυαγγειακή στεφανιαία νόσο καθώς είχε μεγαλύτερο αριθμό νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών σε σχέση με τον πληθυσμό στα κατώτερα τριτημόρια (διάμεση τιμή 2(IQR 1) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 2 (IQR 2) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.038$).

Στον **πίνακα 12** παρουσιάζονται τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού με στεφανιαία νόσο σύμφωνα με την κατανομή της καθεψίνης S σε τριτημόρια. Ως προς τα δημογραφικά χαρακτηριστικά ο πληθυσμός στο ανώτερο τριτημόριο είχε υψηλότερες τιμές C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) (διάμεση τιμή 0.628 (IQR 1.51) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 3.279 (IQR 3.85) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.028$) σε σχέση με τον πληθυσμό στα κατώτερα τριτημόρια. Στατιστικώς σημαντική διαφορά σημειώθηκε στον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών καθώς ο πληθυσμός που κατανεμήθηκε στο ανώτερο τριτημόριο έκφρασης της καθεψίνης S είχε μεγαλύτερο αριθμό νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών σε σχέση με τον πληθυσμό που κατανεμήθηκε στα κατώτερα τριτημόρια (διάμεση τιμή 2(IQR 1) στα κατώτερα τριτημόρια έναντι 3 (IQR 2) στο ανώτερο τριτημόριο, $p=0.036$). Στατιστικώς σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν όσον αφορά την αθηρωμάτωση των περιφερικών αγγείων και την συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας.

Πίνακας 11. Δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού με ΣΝ σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης Β (CTSB) σε τριτημόρια.

	Συνολικά	Κατώτερα τριτημόρια CTSB	Ανώτερο τριτημόριο CTSB	**Στατιστική σημαντικότη- τα (P-value)
N	76	51	25	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	63.8(10.9)	62.3(11.1)	66.8(10.1)	0.079
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	27.4(4.09)	27.9(3.92)	26.6(4.34)	0.234
Φύλο [θήλυ], (%)	66(86.84)	44(86.27)	22(88)	0.834
Καπνός, (%)	36(48.00)	24(48)	12(48)	1
Συστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	133(21.6)	135(22.2)	129(20.3)	0.301
Διαστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	75.9(10.2)	76.3(11.1)	75.4(8.45)	0.703
Αρτηριακή Υπέρταση, (%)	43(57.33)	29(58)	14(56)	0.869
Υπερλιπιδαιμία, (%)	47(62.67)	32(64)	15(60)	0.736
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	23(30.67)	12(24)	11(44)	0.077
*Κρεατινίνη [mg/dl]	0.92(0.39)	0.9(0.3)	1.13(0.67)	0.028
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη,CRP (mg/L)	0.61(2.52)	0.54(1.27)	0.91(2.68)	0.012
*eGFR [ml/min]	82(42.72)	90.3(42.5)	68.3(59.2)	0.018
Φάρμακα				
Αντιαιμοπεταλιακά, (%)	29(39.73)	21(42)	8(34.78)	0.558
Αντιλιπιδαιμικά, (%)	47(62.67)	32(64)	15(60)	0.736
Αναστολείς ΣΡΑΑ, (%)	30(41.10)	21(42.86)	9(37.50)	0.662

β - αποκλειστές, (%)	41(55.41)	28(56)	13(54.17)	0.882
----------------------	-----------	--------	-----------	-------

Αγγειολογικά χαρακτηριστικά

* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος PWV [m/s]	9.3(4.95)	9.2(5.45)	9.4(7)	0.443
* PWV highest tertile	10(33.33)	5(33.33)	5(33.33)	0.999
*Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	26(12)	27(6)	20.5(10)	0.19
*Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	0.86(0.11)	0.86(0.11)	0.86(0.11)	0.692
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτίδων (mm)	0.93(0.26)	0.94(0.31)	0.9(0.14)	0.446
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	0.1(0.24)	0.97(0.26)	1.04(0.23)	0.727
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτίδων αρτηριών(mm)	0.79(0.29)	0.78(0.24)	0.87(0.29)	0.664
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.97(0.17)	0.95(0.15)	1(0.2)	0.655
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες, (%)	41(75.93)	27(75.00)	14(77.78)	0.822
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	44(83.02)	29(82.86)	15(83.33)	0.965
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	38(77.55)	24(75.00)	14(82.35)	0.557
*Αριθμός νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών	2(2)	2(1)	2(2)	0.038
*Κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας, LVEF [%]	50(14)	50(11.5)	45(16)	0.015
*Μέγιστη Τροπονίνη I [ng/ml], διαθέσιμη σε ασθενείς με OEM (n=30)	6(10.2)	2.6(8.25)	9.3(7.55)	0.121

*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25^{ου} και 75^{ου} εκατοστημορίου.

** Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από το ANOVA τεστ ή το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis ή chi-square τεστ

Πίνακας 12. Δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού με ΣΝ σύμφωνα με την κατανομή της έκφρασης της καθεψίνης S (CTSS) σε τριτημόρια.

	Συνολικά	Κατώτερα τριτημόρια CTSS	Ανώτερο τριτημόριο CTSS	**Στατιστική σημαντικότητα (P-value)
N	47	32	15	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	62.8(11.3)	61.1(11.7)	66.7(9.59)	0.115
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	26.8(4.20)	27.0(4.83)	26.2(2.51)	0.538
Φύλο [θήλυ], (%)	4(8.51)	3 (9.38)	1 (6.67)	0.756
Καπνός, (%)	26 (56.5)	19 (61.3)	7 (46.7)	0.348
Συστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	132.6 (22.6)	128.7 (22.5)	141 (21.1)	0.080
Διαστολική αρτηριακή πίεση(mmHg), μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	77.0 (10.2)	77.6 (11.2)	75.9 (7.93)	0.615
Αρτηριακή Υπέρταση, (%)	27 (58.7)	17 (54.8)	10 (66.7)	0.445
Υπερλιπιδαιμία, (%)	32 (69.6)	21 (67.7)	11 (73.3)	0.699
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	14 (30.4)	7 (22.6)	7 (46.7)	0.096
*Κρεατινίνη [mg/dl]	1 (0.5)	0.895 (0.510)	1.1 (0.5)	0.248
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη,CRP (mg/L)	0.758 (3.2)	0.628 (1.51)	3.279 (3.85)	0.028
*eGFR [ml/min]	80.2 (48)	87.6 (46.4)	68.8 (56.4)	0.258
Φάρμακα				
Αντιαιμοπεταλιακά, (%)	14 (31.1)	10 (32.3)	4 (28.6)	0.805
Αντιλιπιδαιμικά, (%)	22 (48.9)	15 (48.4)	7 (50)	0.920

Αναστολείς ΣΡΑΑ, (%)	18 (40)	13 (41.9)	5 (35.7)	0.693
β - αποκλειστές, (%)	40 (44.4)	13 (41.9)	7 (50)	0.614
<i>Αγγειολογικά χαρακτηριστικά</i>				
* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος PWV [m/s]	9.45 (4)	9.2 (2.9)	10.0 (6.55)	0.281
* PWV highest tertile	9 (32.1)	5 (27.8)	4 (40)	0.507
* Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	25 (10)	28 (9)	26 (80)	0.918
* Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	0.846 (0.099)	0.846 (0.113)	0.897 (0.193)	0.433
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτίδων (mm)	0.888 (0.2)	0.86 (0.18)	0.94 (0.24)	0.311
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	0.995 (0.26)	0.958 (0.313)	1.08 (0.12)	0.387
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτίδων αρτηριών(mm)	0.783 (0.283)	0.745 (0.223)	0.94 (0.275)	0.257
* Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	1 (0.2)	1 (0.05)	0.75 (0.3)	0.121
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες, (%)	28 (87.5)	18 (81.8)	10 (100)	0.149
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	28 (87.5)	19 (86.4)	9 (90)	0.773
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	27 (87.1)	17 (81)	10 (100)	0.139
* Αριθμός νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών	2 (2)	2 (1)	3 (2)	0.036
* Κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας, LVEF [%]	50 (15)	50 (15)	47.5 (18)	0.290
* Μέγιστη Τροπονίνη I [ng/ml], διαθέσιμη σε ασθενείς με OEM (n=30)	3.2 (10.7)	5.3 (9.6)	1.34 (11)	0.435

*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25^{ου} και 75^{ου} εκατοστημορίου.

** Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από το ANOVA τεστ ή το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis ή chi-square τεστ

6.3 Πολυπαραγοντικές συσχετίσεις

Οι κύριες μεταβλητές για τις οποίες έγινε στάθμιση ήταν οι κλασσικοί παράγοντες κινδύνου (η ηλικία, η συστολική αρτηριακή πίεση, η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, ο σακχαρώδης διαβήτης, το κάπνισμα) καθώς και το φύλο και ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (eGFR).

Συνολικός πληθυσμός

Από την λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης η σχετική έκφραση του mRNA της καθεψίνης B συσχετίστηκε με τον αριθμό των νοσούντων αρτηριακών δικτύων (OR=1.60 σύγκριση ανώτερου προς κατώτερων τριτημορίων έκφρασης καθεψίνης B , 95% CIs 1.05-2.43, $p=0.029$) μετά από στάθμιση για τις κύριες μεταβλητές και την παρουσία της στεφανιαίας νόσου (**Πίνακας 13**)(**Εικόνα 18**) , ενώ παρόμοια συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε για την έκφραση της καθεψίνης S ($p=0.925$) (**Πίνακας 14**).

Πληθυσμός χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο.

Παρόλο που στην μονοπαραγοντική ανάλυση η έκφραση της καθεψίνης B ανά τριτημόριο δεν συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με το ανώτερο τριτημόριο της ταχύτητας του σφυγμικού κύματος PWV ($p=0.200$)(**πίνακας 9**), μετά από στάθμιση με τις κύριες μεταβλητές φαίνεται ότι ο πληθυσμός του ανώτερου τριτημορίου έκφρασης της καθεψίνης B έχει τετραπλάσια πιθανότητα να ανήκει στο ανώτερο τριτημόριο της ταχύτητας του σφυγμικού κύματος σε σχέση με τον πληθυσμό των κατώτερων τριτημορίων έκφρασης της καθεψίνης B (OR=4.38, 95% CIs 1.20-15.9, $p=0.025$)(**Πίνακας 13**)(**Εικόνα 19**). Η έκφραση της καθεψίνης S τόσο στην μονοπαραγοντική ($p=0.101$) (**Πίνακας 10**) όσο και κ στην πολυπαραγοντική ανάλυση ($p=0.084$) (**Πίνακας 14**) δεν φάνηκε να σχετίζεται με την ταχύτητα σφυγμικού κύματος.

Πληθυσμός με στεφανιαία νόσο.

Ο πληθυσμός με στεφανιαία νόσο στο ανώτερο τριτημόριο έκφρασης της καθεψίνης B διατήρησε τη συσχέτιση με τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών που είχε στην μονοπαραγοντική ανάλυση και μετά από στάθμιση με τις κύριες μεταβλητές και τον τύπο της στεφανιαίας νόσου (σταθερή ΣΝ ή OEM) (OR=3.34, 95% CIs 1.011-11.05, p=0.048) (**Πίνακας 13, Εικόνα 20**) . Επιπλέον ο πληθυσμός στο ανώτερο τριτημόριο έκφρασης της καθεψίνης B μετά από στάθμιση για τις κύριες μεταβλητές παρουσίασε αυξημένη πιθανότητα κατά 3,5 φορές να έχει χαμηλό κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας (LVEF<45%) σε σχέση με τον πληθυσμό των κατωτέρων τριτημορίων έκφρασης της καθεψίνης B (OR=3.4, 95% CIs 1.01-11.8, p=0.049)(**Πίνακας 13**). Όταν πραγματοποιήθηκε στάθμιση για επιπρόσθετη μεταβλητή όπως ο αριθμός των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών η συσχέτιση αυτή δεν παρέμεινε στατιστικά σημαντική (p=0.198).

Παρόμοια με την καθεψίνη B και η έκφραση της καθεψίνης S στο ανώτερο τριτημόριο διατήρησε τη συσχέτιση που είχε στην μονοπαραγοντική ανάλυση με τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών και μετά από στάθμιση με τις κύριες μεταβλητές και τον τύπο της στεφανιαίας νόσου (OR=5.18, 95% CIs 1.21-22.04, p=0.026) (**Πίνακας 14, Εικόνα 20**)

Πίνακας 13. Ανεξάρτητη συσχέτιση της έκφρασης της CTSB με τα τελικά σημεία της μελέτης σε πολυπαραγοντική τακτική ή λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης.

	Όλος ο πληθυσμός (n=224)		Πληθυσμός με ΣΝ (n=76)		Πληθυσμός με ΣΝ (n=76)		Πληθυσμός χωρίς ΣΝ (n=148)	
Παράμετροι	OR 95% Διαστήματα εμπιστοσύνης *	P- value	OR 95% Διαστήματα εμπιστοσύνης *	P- value	OR 95% Διαστήματα εμπιστοσύνης *	P- value	OR 95% Διαστήματα εμπιστοσύνης *	P- value
Αριθμός νοσούντων αγγειακών δικτύων			Κλάσμα εξωθήσεως αριστερής κοιλίας LVEF<45%		Αριθμός νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών		Ταχύτητα σφυγμικού κύματος (PWV, Ανώτερο τριτημόριο)	
Ανώτερο τριτημόριο CTSB	1.60 (1.05- 2.43)	0.029	3.45 (1.01-11.8)	0.049	3.34 (1.011-11.05)	0.048	4.38 (1.20-15.9)	0.025

*Τυπικό σφάλμα για σύγκριση ανώτερου έναντι κατωτέρων τριτημορίων της αναλογίας της καθεψίνης B.

Όλα τα μοντέλα για τις εξαρτημένες αγγειακές μεταβλητές είναι προσαρμοσμένα για την ηλικία, το φύλο, την κάθαρση κρεατινίνης, την συστολική αρτηριακή πίεση, την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, τον σακχαρώδη διαβήτη, το κάπνισμα και την παρουσία καρδιαγγειακής νόσου. Το μοντέλο για το κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας ως ανεξάρτητη μεταβλητή είναι προσαρμοσμένο για την ηλικία, το φύλο, την κάθαρση κρεατινίνης, την υπέρταση και τον σακχαρώδη διαβήτη και σε δεύτερη φάση για τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών.

Συντμήσεις: ΣΝ, Στεφανιαία νόσος

Πίνακας 14. Ανεξάρτητη συσχέτιση της έκφρασης της CTSS με τα τελικά σημεία της μελέτης σε πολυπαραγοντική τακτική ή λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης.

	Όλος ο πληθυσμός (n=98)		Πληθυσμός με ΣΝ (n=47)		Πληθυσμός με ΣΝ (n=47)		Πληθυσμός χωρίς ΣΝ (n=51)	
	Αριθμός νοσούντων αγγειακών δικτύων		Κλάσμα εξωθήσεως αριστερής κοιλίας LVEF<45%		Αριθμός νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών		Ταχύτητα σφυγμικού κύματος (PWV, Ανώτερο τριτημόριο)	
Παράμετροι	OR	P-	OR	P-	OR	P-	OR	P-
	95% Διαστήματα εμπιστοσύνης *	value	95% Διαστήματα εμπιστοσύνης *	value	95% Διαστήματα εμπιστοσύνης *	value	95% Διαστήματα εμπιστοσύνης *	value
Ανώτερο τριτημόριο CTSS	1.05 (0.30- 3.39)	0.925	1.56 (0.3-7.88)	0.587	5.18 (1.21-22.04)	0.026	5.41 (0.798-36.7)	0.084

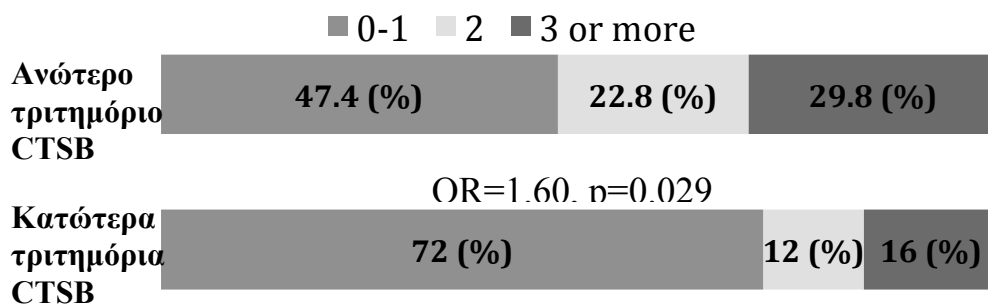
*Τυπικό σφάλμα για σύγκριση ανώτερου έναντι κατωτέρων τριτημορίων της αναλογίας της καθεψίνης S.

Όλα τα μοντέλα για τις εξαρτημένες αγγειακές μεταβλητές είναι προσαρμοσμένα για την ηλικία, το φύλο, την κάθαρση κρεατινίνης, την συστολική αρτηριακή πίεση, την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, τον σακχαρώδη διαβήτη, το κάπνισμα και την παρουσία καρδιαγγειακής νόσου. Το μοντέλο για το κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας ως ανεξάρτητη μεταβλητή είναι προσαρμοσμένο για την ηλικία, το φύλο, την κάθαρση κρεατινίνης, την υπέρταση και τον σακχαρώδη διαβήτη και σε δεύτερη φάση για τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών.

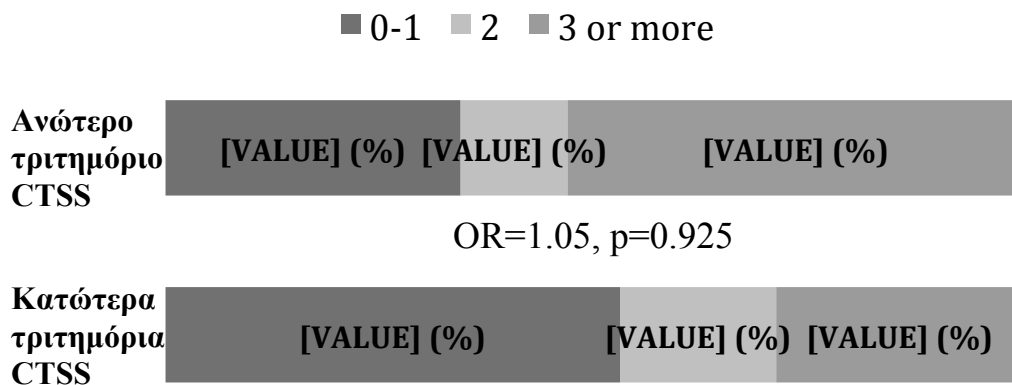
Συντμήσεις: ΣΝ, Στεφανιαία νόσος

Εικόνα 18. Συσχέτιση της αναλογίας της καθεψίνης B με τον αριθμό των νοσούντων αγγειακών δικτύων. Οι ασθενείς που συγκαταλέγονται στο ανώτερο τριτημόριο της έκφρασης της καθεψίνης B των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος είχαν περισσότερες πιθανότητες να έχουν αυξημένο αριθμό νοσούντων αγγειακών δικτύων σε σχέση με τους ασθενείς που συγκαταλέγονται στα κατώτερα τριτημόρια. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από τη λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης μετά από προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο, την συστολική αρτηριακή πίεση, την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, τον καπνός, τον σακχαρώδη διαβήτη και τον πληθυσμό ταξινόμησης (πληθυσμός χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο, πληθυσμός με σταθερή στεφανιαία νόσο ή πληθυσμός με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο).

Συσχέτιση της αναλογίας της CTSB με τον αριθμό των νοσούντων αγγειακών δικτύων

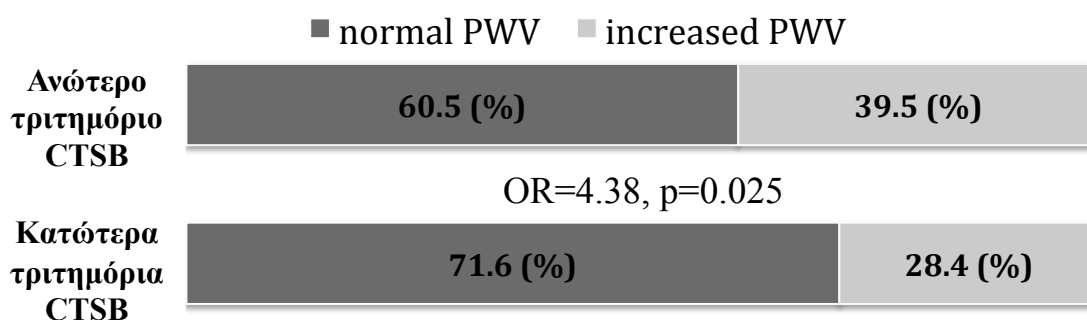


Συσχέτιση της αναλογίας της CTSS με τον αριθμό των νοσούντων αγγειακών δικτύων

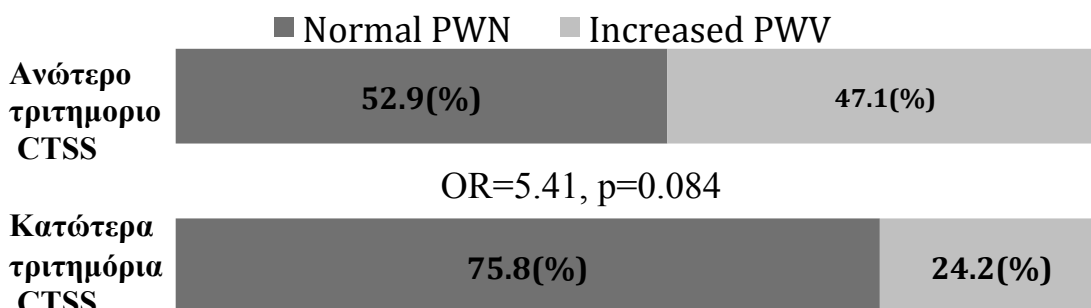


Εικόνα 19. Συσχέτιση της αναλογίας της έκφρασης της καθεψίνης B και της καθεψίνης S με την αυξημένη ταχύτητα σφυγμικού κύματος, σε ασθενείς χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της καθεψίνης B των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος συσχετίστηκαν με αυξημένη ταχύτητα σφυγμικού κύματος σε ασθενείς χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο, ενώ η καθεψίνη S δεν έδειξε σημαντική συσχέτιση με την PWV. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από τη λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης με την ηλικία, το φύλο, την συστολική αρτηριακή πίεση, την κάθαρση κρεατινίνης, την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη και τον σακχαρώδη διαβήτη ως συμμεταβλητές.

Συσχέτιση της αναλογίας της CTSB με την αυξημένη PWV σε ασθενείς χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο



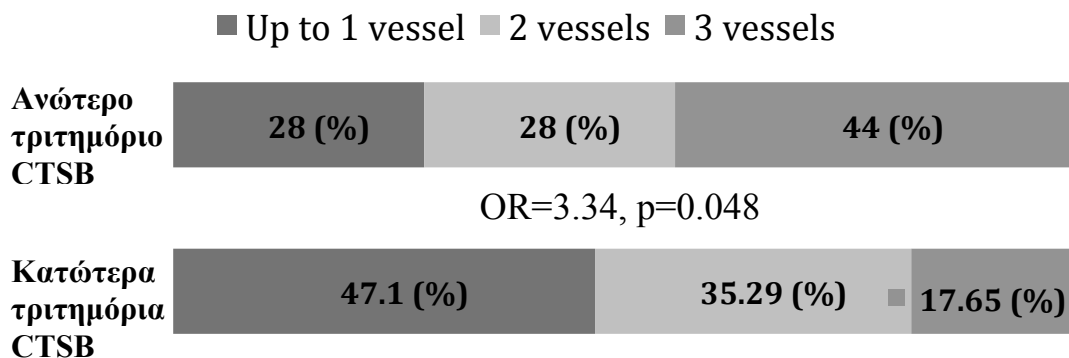
Συσχέτιση της αναλογίας της CTSS με την αυξημένη PWV σε ασθενείς χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο



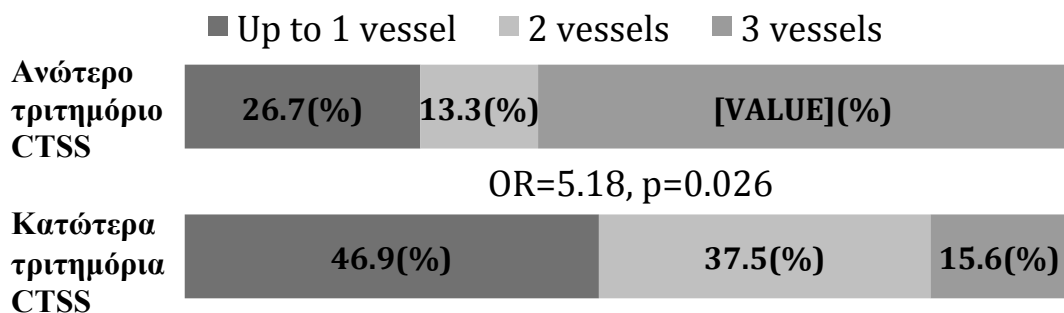
Εικόνα 20. Συσχέτιση της αναλογίας της έκφρασης της καθεψίνης B και της καθεψίνης S με τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών στον πληθυσμό με στεφανιαία νόσο. Οι ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο και οι ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο που συγκαταλέγονται στο ανώτερο τριτημόριο της έκφρασης της καθεψίνης B και της καθεψίνης S των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος είχαν περισσότερες πιθανότητες να έχουν πολυαγγειακή στεφανιαία νόσο σε σχέση με τους ασθενείς που συγκαταλέγονται στα κατώτερα τριτημόρια.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας προκύπτει από τη λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης μετά από προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο, την συστολική αρτηριακή πίεση, την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, τον καπνό, τον σακχαρώδη διαβήτη και τον τύπο ΣΝ (σταθερή ή οξύ στεφανιαίο σύνδρομο).

Συσχέτιση της αναλογίας της CTSB με τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών στους ασθενείς με ΣΝ



Συσχέτιση της αναλογίας της CTSS με τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών στους ασθενείς με ΣΝ



6.4 Πρόοδος αθηρωμάτωσης και καθεψίνες

Στον **πίνακα 15** παρατίθενται συγκρίνονται τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού που δεν επανεξετάστηκε (FU-), με τα χαρακτηριστικά της πρώτης εκτίμησης, του πληθυσμού που επανεξετάστηκε (FU+). Στον **πίνακα 16** παρατίθενται τα δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά της δεύτερης εκτίμησης του πληθυσμού που επανεξετάστηκε μετά από διάμεσο χρονικό διάστημα 3 ετών. Από αυτό τον πληθυσμό 34 άτομα έπασχαν από ΣΝ και 66 άτομα δεν είχαν κλινικά έκδηλη ΣΝ. Κατά την διάρκεια της παρακολούθησης, ο πληθυσμός που κατανεμήθηκε στο ανώτερο τριτημόριο έκφρασης της CTSS με υψηλή PWV στην πρώτη εκτίμηση παρουσίασε περαιτέρω αύξηση της έκφρασης της CTSS και της PWV ($p=0.043$ για την αλληλεπίδραση μεταξύ των ομάδων τριτημορίων CTSS (**Εικ. 21**), σε αντίθεση με τον πληθυσμό που κατανεμήθηκε στο κατώτερο τριτημόριο έκφρασης της CTSS με χαμηλότερες τιμές PWV. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν αναφορικά με την συσχέτιση της αυξημένης έκφρασης της CTSS του ανώτερου τριτημορίου με το αυξημένο AI ($p=0.030$ για την αλληλεπίδραση μεταξύ των ομάδων τριτημορίων CTSS) (**Εικ. 22**). Ενώ όσον αφορά την CTSB τόσο σε σχέση με την PWV ($p=0.575$ για την αλληλεπίδραση μεταξύ των ομάδων τριτημορίων CTSB) (**Εικ. 21**) όσο και με τον AI ($p=0.757$ για την αλληλεπίδραση μεταξύ των ομάδων τριτημορίων CTSB) δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στα 3 έτη (**Εικ.22**).

Πίνακας 15. Δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά της πρώτης εκτίμησης (baseline), του πληθυσμού που επανεξετάστηκε(FU+) και του πληθυσμού που δεν επανεξετάστηκε .

<i>Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου</i>			
	FU- n=149	FU+ n=100	p-value
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	58.1 (12.4)	56.1 (9.50)	0.165
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	27.0 (4.87)	27.5 (4.87)	0.431
Φύλο [θήλυ], (%)	76 (51)	47 (47)	0.535
Καπνός, (%)	66 (44.6)	48 (48)	0.598
Αρτηριακή Υπέρταση, (%)	48 (32.4)	34 (34)	0.797
Υπερλιπιδαιμία, (%)	60 (40.5)	74 (74)	<0.001
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	20 (13.5)	12 (12)	0.727
*Κρεατινίνη [mg/dl]	0.7 (0.3)	0.7 (0.2)	0.655
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη, CRP (mg/L)	0.19 (0.79)	0.1 (0.85)	0.362
*eGFR [ml/min]	108 (41.6)	107.6 (31.2)	0.843
Stable Cad, (%)	36 (24.2)	15 (15)	0.079
STEMI, (%)	10 (6.71)	16 (16)	0.019
NSTEMI, (%)	7 (4.7)	3 (3)	0.503
<i>Φάρμακα</i>			
Αντιαιμοπεταλιακά, (%)	20 (13.6)	11 (11)	0.544
Αντιλιπιδαιμικά, (%)	49 (33.3)	28 (28)	0.374
Αναστολείς ΣΡΑΑ, (%)	33 (22.6)	24 (24)	0.799
β - αποκλειστές, (%)	38 (25.9)	19 (19)	0.210

<i>Αγγειολογικά χαρακτηριστικά</i>			
* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος, PWV [m/s]	8.4 (2)	8.2 (1.65)	0.446
*Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	29 (12)	30 (10)	0.570
*Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα από 6 κρωτιδικά σημεία (mm)	0.817 (0.168)	0.81 (0.132)	0.629
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών κρωτιδίων (mm)	0.835 (0.255)	0.8 (0.248)	0.745
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα κρωτιδικών βολβών(mm)	0.918 (0.27)	0.998 (0.243)	0.140
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω κρωτιδίων αρτηρ.(mm)	0.76 (0.2)	0.76 (0.29)	0.926
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.65 (0.35)	0.7 (0.35)	0.855
Παρουσία αθηρ. πλάκας στο κρωτιδικό σύστημα, (%)	49 (40.2)	50 (54.4)	0.039
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	47 (38.8)	42 (45.7)	0.318
Παρουσία αθηρ. πλάκας στις κρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες,(%)	58 (49.2)	58 (63.7)	0.035
*Αριθμός νοσούντων αρτηριακών δικτύων	1 (1)	1 (1)	0.313
*Αριθμός νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών	2 (1)	1 (1)	0.351
*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25 ^{ου} και 75 ^{ου} εκατοστημορίου.			

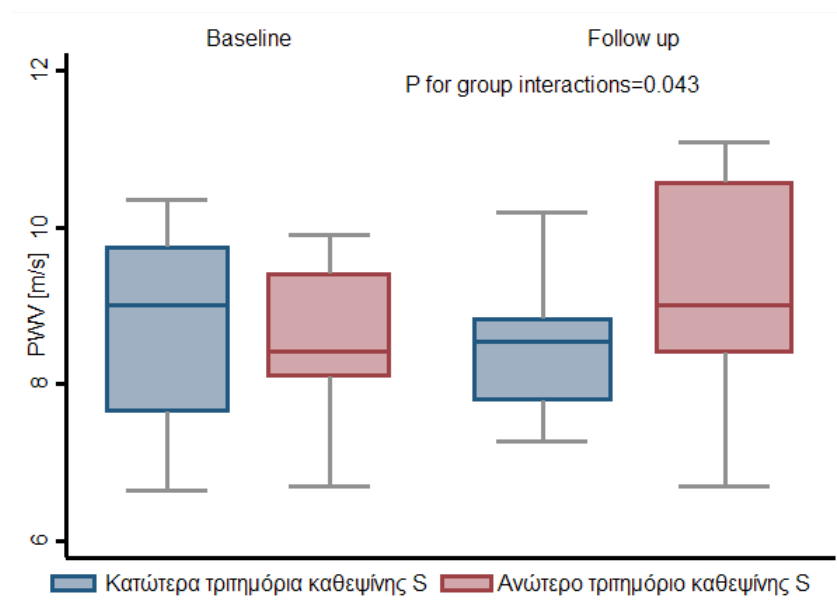
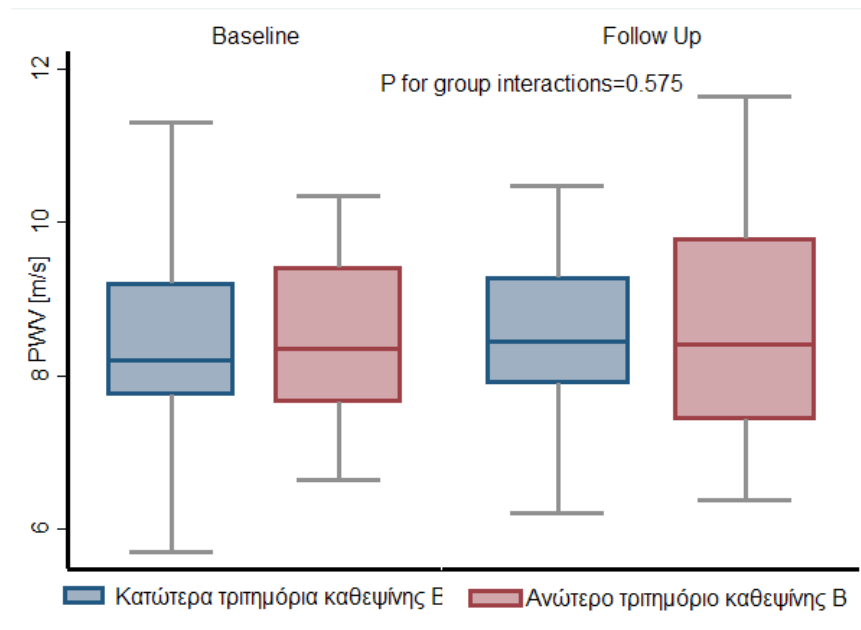
Πίνακας 16. Δημογραφικά και αγγειολογικά χαρακτηριστικά της δεύτερης εκτίμησης του συνολικού πληθυσμού που επανεξετάστηκαν σε διάμεσο χρονικό διάστημα 3 ετών (n=100).

<i>Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου</i>	
Ηλικία [έτη], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	58.5 (9.0)
Δείκτη μάζας σώματος [kg/m ²], μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	27.8 (4.87)
Φύλο [θήλυ], (%)	47 (47)
Καπνός, (%)	0
Αρτηριακή Υπέρταση, (%)	12 (12.1)
Υπερλιπιδαιμία, (%)	10 (10)
Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (%)	6 (6)
*Κρεατινίνη [mg/dl]	0.78 (0.23)
*C -αντιδρώσα πρωτεΐνη, CRP (mg/L)	1.47 (3.99)
*eGFR [ml/min]	96.0 (23.3)
Stable Cad, (%)	15 (15)
STEMI, (%)	17 (17)
NSTEMI, (%)	3 (3)
<i>Φάρμακα</i>	
Αντιαμοπεταλικά, (%)	18 (18)
Αντιλιπιδαιμικά, (%)	52 (52)
Αναστολείς ΣΡΑΑ, (%)	39 (39)
β - αποκλειστές, (%)	34 (34)
<i>Αγγειολογικά χαρακτηριστικά</i>	
* Ταχύτητα σφυγμικού κύματος, PWV [m/s]	9 (2.55)
*Δείκτης επαύξησης αρτηριακής πίεσης, AI	32 (10)
*Συνδυασμένο πάχος έσω μέσω χιτώνα	0.84 (0.208)

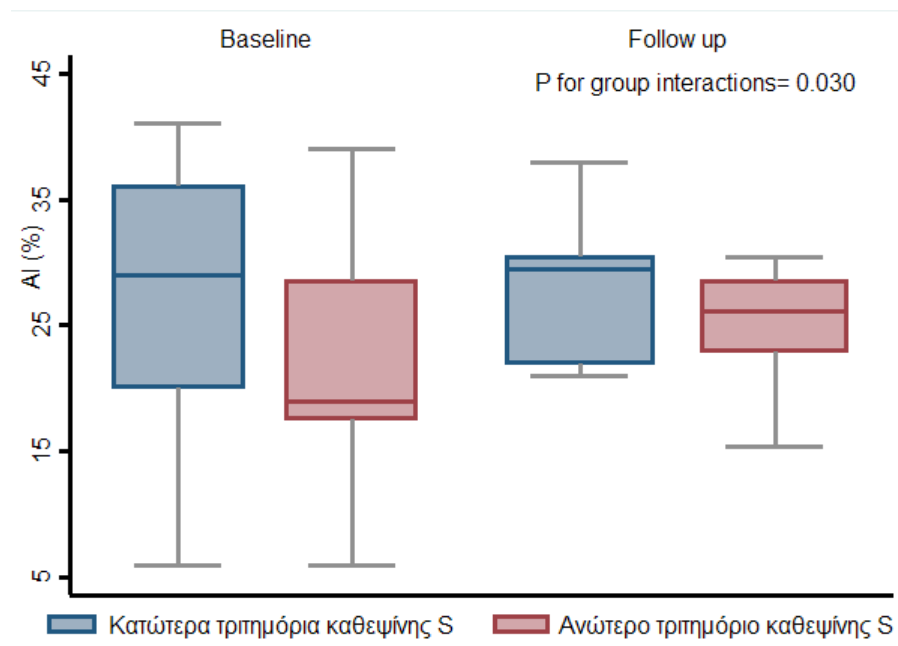
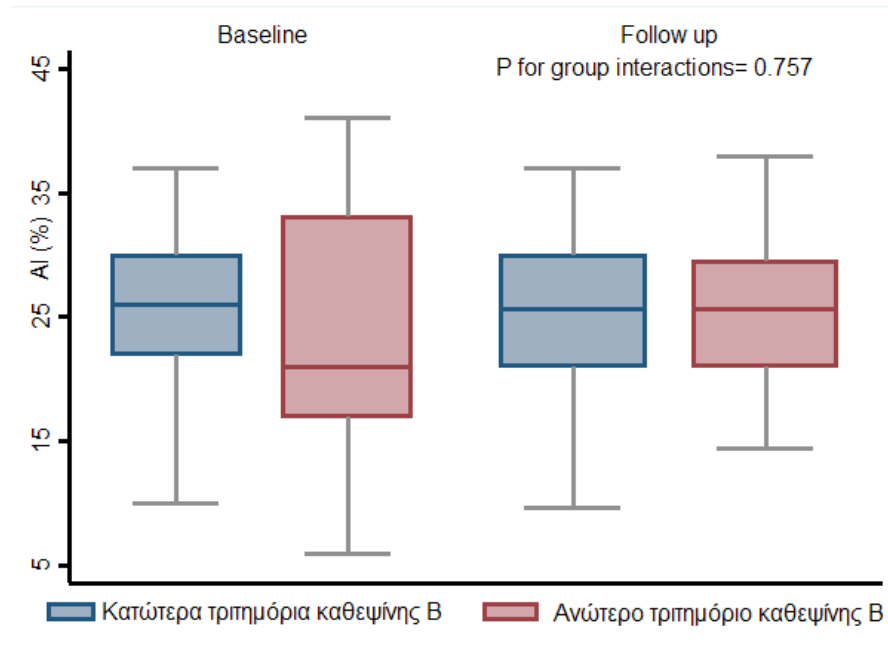
από 6 καρωτιδικά σημεία (mm)	
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα κοινών καρωτίδων (mm)	0.8 (0.228)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα καρωτιδικών βολβών(mm)	1.04 (0.26)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα έσω καρωτίδων αρτηριών(mm)	0.74 (0.32)
*Πάχος έσω μέσου χιτώνα μηριαίων αρτηριών (mm)	0.8 (0.3)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στο καρωτιδικό σύστημα, (%)	58 (58)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις μηριαίες αρτηρίες, (%)	49 (49)
Παρουσία αθηρωματικής πλάκας στις καρωτίδες ή/και στις μηριαίες αρτηρίες,(%)	70 (70)
*Αριθμός νοσούντων αρτηριακών δικτύων	2 (1)

*Μεταβλητές που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και χρησιμοποιείται η διάμεσος τιμή και το εύρος τιμών (IQR) μεταξύ 25^{ου} και 75^{ου} εκατοστημορίου.

Εικόνα 21. Συγκριτικά οι συσχετίσεις των τριτημορίων έκφρασης της CTSB και της CTSS με την PWV του συνολικού πληθυσμού που επανεξετάστηκε, στην πρώτη εξέταση (baseline) και μετά από διάμεσο διάστημα 3 ετών (follow up). Η αύξηση της καθεψίνης S στο ανώτερο τριτημόριο κατά την 3 ετή παρακολούθηση συσχετίστηκε με αύξηση και της PWV, ενώ παρόμοια συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε για την CTSB. Για την λογιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν linear mixed models.



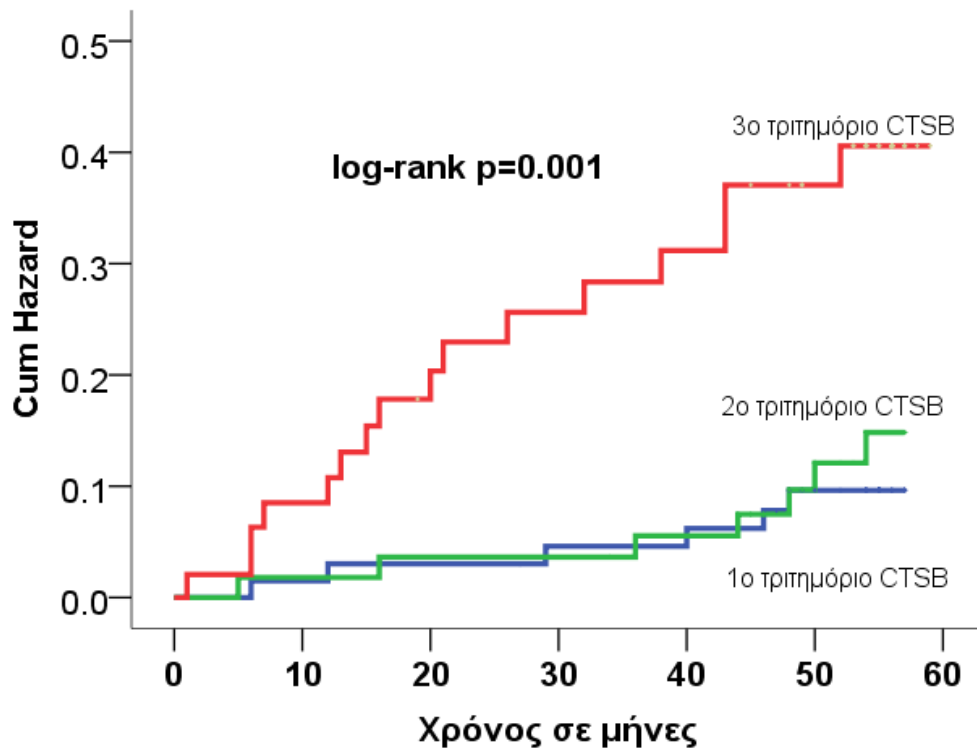
Εικόνα 22. Συγκριτικά οι συσχετίσεις των τριτημορίων έκφρασης της CTSB και της CTSS με τον AI του συνολικού πληθυσμού που επανεξετάστηκε, στην πρώτη εξέταση (baseline) και μετά από διάμεσο χρονικό διάστημα 3 ετών (follow up). Η αύξηση της καθεψίνης S στο ανώτερο τριτημόριο κατά την 3 ετή παρακολούθηση συσχετίστηκε με αύξηση και του AI, ενώ παρόμοια συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε για την CTSB. Για την λογιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν linear mixed models.



6.5 Καρδιαγγειακά συμβάματα και CTSB

Συνολικά το σύμπλοκο καταληκτικό σημείο καταγράφηκε σε 32 από τους 187 ασθενείς που παρακολούθηθηκαν. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 48.6 ± 12.9 μήνες. Παρατηρήθηκε ότι κίνδυνος εμφάνισης τους σύμπλοκου τελικού σημείου της μελέτης στους ασθενείς που κατανεμήθηκαν στο υψηλότερο τριτημόριο της έκφρασης CTSB ήταν περίπου τετραπλάσιος σε σχέση με αυτούς στα κατώτερα τριτημόρια (HR 4.335, 95%CI 1.70-11.09, $p=0.002$, log-rank $p=0.001$, **Εικόνα 23**). Μετά από στατιστική διόρθωση για ηλικία, φύλο, σακχαρώδη διαβήτη, αρτηριακή υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, κάπνισμα και την υπο-ομάδα που ανήκε ο κάθε ασθενής με Cox Regression ανάλυση, η διαφορά αυτή παρέμεινε στατιστικά σημαντική (adjusted HR 3.88, 95%CI 1.43-10.53, ανώτερο έναντι κατωτέρων τριτημορίων, $p=0.008$). Λόγω μικρού αριθμού παρατηρήσεων δεν διενεργήθηκε ανάλυση επιβίωσης για την CTSS.

Εικόνα 23. Διάγραμμα Nelson–Aalen που δείχνει τον κίνδυνο εμφάνισης του σύμπλοκου τελικού σημείου συμβαμάτων του πληθυσμού όπως αυτός κατανεμήθηκε σε τριτημόρια έκφρασης της CTSB. Σύμπλοκο τελικό σημείο: θάνατος από οποιαδήποτε αιτία, θανατηφόρο ή μη οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, ανάγκη για επαναιμάτωση, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ), περιφερική αρτηριοπάθεια, οξύ αορτικό σύνδρομο, διάγνωση νέας ή νοσηλεία για καρδιακή ανεπάρκεια και καρδιακή ανακοπή.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7. Συζήτηση

7.1 Γενικά

Τα κύρια καινοτόμα ευρήματα στην παρούσα μελέτη έδειξαν ότι η σχετική έκφραση της καθεψίνης B και της καθεψίνης S στα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος σχετίζονται με την αθηροσκληρυντική νόσο σε πολλαπλά αγγειακά δίκτυα, από τα πρώιμα στάδια της νόσου με αλλαγές στην αρτηριακή σκληρία, την μη αποφρακτική περιφερική αρτηριακή νόσο έως και την παρουσία και έκταση της κλινικά έκδηλης στεφανιαίας νόσου όπως είναι τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα. Σημαντικό είναι ότι πιλοτική ανάλυση σε πληθυσμό που παρακολούθηθηκε για 3 έτη έδειξε συσχέτιση της CTSS με την πρόοδο της αρτηριακής σκληρίας, εύρημα που ενισχύει τη σχέση αυτής της πρωτεΐνης με την αγγειακή γήρανση. Επιπλέον παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της καθεψίνης B με την λειτουργία του μυοκαρδίου όπως αυτή εκφράζεται με το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας. Τέλος παρατηρήσαμε σχέση της αυξημένης έκφρασης της CTSS με τα καρδιαγγειακά συμβάματα, εύρημα που ενισχύει την κλινική σημασία των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής.

Καθεψίνη B

Σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καθεψίνης B με την ηλικία του πληθυσμού (264,265). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι σε συνδυασμό με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου η έκφραση της καθεψίνης B στο περιφερικό αίμα αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα που καθορίζει την αρτηριακή σκληρία όπως αυτή εκτιμάται από την μέτρηση της ταχύτητας του σφυγμικού κύματος. Η ταχύτητα του σφυγμικού κύματος θεωρείται «gold standard» δείκτης για την εκτίμηση της αρτηριακής σκληρίας στους ανθρώπους (263). Η αγγειακή γήρανση μέσω πολύπλοκων μηχανισμών στο αγγειακό τοίχωμα οδηγεί σε αύξηση της αρτηριακής σκληρίας και θεωρείται ότι η αρτηριακή σκληρία εκφράζει το βαθμό της αγγειακής γήρανσης (55). Ως εκ τούτου η ταχύτητα σφυγμικού κύματος θεωρείται επίσης αξιόπιστος δείκτης της αγγειακής γήρανσης (55). Το εύρημα της συσχέτισης της έκφρασης της καθεψίνης B και της ταχύτητας σφυγμικού κύματος

συνιστά καινοτόμο εύρημα στην βιβλιογραφία και υποστηρίζει την συμμετοχή της καθεψίνης Β στους μηχανισμούς αγγειακής γήρανσης. Επιπλέον παρατηρήσαμε ότι η καθεψίνη Β συσχετίστηκε με την αρτηριακή υπέρταση. Δεδομένου ότι η αρτηριακή σκληρία έχει μια αιτιολογική σχέση με την ανάπτυξη της αρτηριακής υπέρτασης (266) τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουν ακόμη περισσότερο την συμμετοχή της καθεψίνης Β στην αρτηριακή σκληρία και την αρτηριακή νόσο. Πράγματι, πειραματικές μελέτες σε επίμυες αναφέρουν αυξημένη δραστηριότητα στα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής των υπερτασικών ποντικών σε σχέση με των νορμοτασικών, υποστηρίζοντας ότι η αρτηριακή υπέρταση ενεργοποιεί ανεξάρτητα την καθεψίνη Β στα ενδοθηλιακά κύτταρα (197), ενώ μελέτη σε εγκύους συσχέτισε τα αυξημένα επίπεδα καθεψίνης Β στο αίμα με την προεκλαμψία (267). Φαίνεται ότι σε συνθήκες υπέρτασης η αυξημένη ενδοκυττάρωση και αυτοφαγία ενεργοποιεί την καθεψίνη Β στα αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία ευνοούν τον κυτταρικό τραυματισμό στο αρτηριακό τοίχωμα (268), το οποίο με τη σειρά του μπορεί να επιδεινώσει την αρτηριακή σκληρία (269). Επιπλέον η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε την αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση της έκφρασης της καθεψίνης Β με την κάθαρση κρεατινίνης μέσω του δείκτη αξιολόγησης του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (eGFR). Προηγούμενη μελέτη σε υγιή πληθυσμό παρατήρησε ανεξάρτητη συσχέτιση της καθεψίνης Β με το eGFR (270). Η επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας σχετίζεται με την επιταχυνόμενη αγγειακή γήρανση της αορτής και την αύξηση της αρτηριακής σκληρίας (138). Συνολικά, τα αποτελέσματα της διατριβής παρουσιάζουν συσχετίσεις της καθεψίνης Β με την ηλικία, την αρτηριακή σκληρία, την αρτηριακή υπέρταση και την νεφρική δυσλειτουργία υποδεικνύοντας πιθανή σχέση της καθεψίνης Β με τους μηχανισμούς της επιταχυνόμενη αγγειακής γήρανσης, πεδίο που χρήζει περαιτέρω έρευνας. Αυτό ήταν κυρίως εμφανές στον πληθυσμό χωρίς κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο σε αντίθεση με του ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Αυτή η παρατήρηση πιθανώς να υποδεικνύει ότι κατά την προχωρημένη διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης, τα επιζήμια αποτελέσματα της καθεψίνης Β μπορεί να επικαλύπτουν της σχέση της PWV με την καθεψίνη Β στους υψηλού κινδύνου ασθενείς.

Επιπροσθέτως της επιταχυνόμενης αγγειακής γήρανσης, στην μελέτη μας η έκφραση της καθεψίνης Β συσχετίστηκε με την υποκλινική περιφερική αλλά και κλινικά

έκδηλη στεφανιαία αθηροσκλήρυνση. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν ότι η καθεψίνη B εμπλέκεται από πολύ νωρίς ,στα πρώιμα στάδια της αθηρογένεσης και συνεχίζει σε όλη την εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης έως και την κλινική της εμφάνιση. Επιπλέον και σε συμφωνία με τον παραπάνω ισχυρισμό βρήκαμε ότι η έκφραση της καθεψίνης B μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αθηρωματικού φορτίου καθώς η έκφρασή της συσχετίστηκε ανεξάρτητα με τον αριθμό των νοσούντων αρτηριακών δικτύων και τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών. Βέβαια μεγαλύτερες προοπτικές μελέτες απαιτούνται για την περαιτέρω διερεύνηση αυτού του ευρήματος. Από άποψη μηχανισμού, τα ευρήματα μας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία όπου πρόσφατες πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν κεντρικό ρόλο της καθεψίνης B στην αγγειακή φλεγμονή και ακολούθως στην αθηροσκλήρυνση (138,227). Αύξηση των επιπέδων έκφρασης της καθεψίνης B έχει παρατηρηθεί σε αθηρωματικές πλάκες επίμυων με αθηροσκλήρυνση (227,270) ενώ ενεργοποιημένα μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα οδηγούν σε αυξημένη έκφραση και απελευθέρωση της καθεψίνης B στον έσω χιτώνα αθηρωματικών πλακών ανθρώπων (271). Η δραστηριότητα της καθεψίνης B έχει συσχετιστεί επίσης και με αυξημένη διάτμηση απολιποπρωτεΐνης A-I (ApoA-I) από μακροφάγα ανθρώπινων μονοκυττάρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο σε αθηρωματικές πλάκες ανθρώπων συνιστώντας περιορισμό της αθηροπροστατευτικής δράσης της απολιποπρωτεΐνης A από την δράση της καθεψίνης B . Σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι η έκφραση της καθεψίνης B συσχετίστηκε με την υπερλιπιδαιμία και βρέθηκε αυξημένη στον πληθυσμό με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Λαμβάνοντας υπόψιν και τον πιθανό ρόλο της καθεψίνης B στην αποσταθεροποίηση της πλάκας μέσω της ικανότητάς της να διασπά την ελαστίνη και το κολλαγόνο (186,227), περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για να μελετηθεί ο κλινικός ρόλος που έχει η καθεψίνη B στην ρήξη της πλάκας και στο OEM. Προς αυτή την κατεύθυνση, αυξημένη δραστηριότητα της καθεψίνης B αναφέρεται σε ασταθείς πλάκες ανθρώπων με νόσο καρωτίδων που επαναιματώθηκαν υποστηρίζοντας τον ενεργό ρόλο της καθεψίνης B στην ευαλωτότητα της πλάκας (272), ενώ σε μελέτη με 62 ασθενείς με νόσο καρωτίδων που υπεβλήθησαν σε ενδαρτηρεκτομή η δραστηριότητα της καθεψίνης B

βρέθηκε αυξημένη στις ασταθείς πλάκες όπως αυτό απεικονίστηκε μοριακά, υπερηχογραφικά και ιστολογικά (199).

Επιπλέον αυξημένη έκφραση καθεψίνης B έχει συσχετιστεί με καρδιακή ανεπάρκεια και χαμηλό κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας σε επίμυες μετά από μυοκαρδιακή κόπωση (273), καθώς και σε ασθενείς με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (274), υποστηρίζοντας τον ρόλο της καθεψίνης B στην απόπτωση των μυοκυττάρων της καρδιάς. (275). Προς την ίδια κατεύθυνση βρήκαμε αυξημένη έκφραση της καθεψίνης B στον πληθυσμό με χαμηλό κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας (<45%), εύρημα που κυρίως προέκυψε από την συσχέτιση της καθεψίνης B με την σοβαρότητα της στεφανιαίας νόσου και υποστηρίζει έναν έμμεσο ρόλο της καθεψίνης B στην συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας στους ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια.

Στην 3ετή παρακολούθηση μέρους του συνολικού πληθυσμού, η αυξημένη έκφραση της καθεψίνης B συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων, εύρημα που επιβεβαιώνεται και από την μελέτη CLARICOL όπου αυξημένα κυκλοφορούντα επίπεδα καθεψίνης B συσχετίστηκαν με καρδιαγγειακά συμβάματα σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο (217) υποστηρίζοντας έτσι την κλινική σημασία της καθεψίνης B στην καρδιαγγειακή νόσο. Σε σχέση με την μελέτη CLARICOL όπου αξιολογήθηκε η καθεψίνη B πλάσματος, στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκε η έκφραση της καθεψίνης B. Συνεπώς τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επιπλέον υποδεικνύουν ότι η CTSB είναι πιθανό να συσχετίζεται με τα καρδιαγγειακά συμβάματα μέσω αυξημένης αγγειακής φλεγονής που προκαλείται από PBMCs/μακροφάγα προσθέτοντας νέα μηχανιστικά δεδομένα σε αυτό το ερευνητικό πεδίο.

Καθεψίνη S

Εκτός της καθεψίνης B και η καθεψίνη S φαίνεται να συμμετέχει στους μηχανισμούς αγγειακής γήρανσης καθώς από τα αποτελέσματα της διατριβής προκύπτει ότι η έκφραση της καθεψίνης S στα PBMCs σχετίζεται με την ηλικία, την αρτηριακή υπέρταση, την νεφρική λειτουργία και την αρτηριακή σκληρία όπως αυτή αξιολογήθηκε με την μέτρηση της PWV. Σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της

καθεψίνης S παρατηρήθηκε με την ηλικία του συνολικού πληθυσμού. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, όπου σε διαβητικούς ασθενείς η καθεψίνη S πλάσματος αυξήθηκε με την ηλικία (211). Επίσης σε επίμυες η έκφραση της καθεψίνης S αυξήθηκε στα μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου με την ηλικία, γεγονός που υποστηρίζει την συμμετοχή της καθεψίνης S στην διαδικασία γήρανσης του ΚΝΣ(276). Αυξημένη έκφραση της καθεψίνης S παρατηρήθηκε και στον πληθυσμό με αρτηριακή υπέρταση. Η υπερέκφραση του mRNA της καθεψίνης S έχει συσχετιστεί με επιπλοκές της αρτηριακής υπέρτασης όπως η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας και η υπερτασική καρδιοπάθεια (277), ενώ σε επίμυες που εκτέθηκαν σε παροδική υπεροξαιμία η αύξηση της έκφρασης της καθεψίνης S σχετίστηκε με αλλαγές του αρτηριακού τοιχώματος, με μείωση της αναλογίας ελαστίνης /κολλαγόνου και αύξηση της εναπόθεσης κολλαγόνου το οποίο σχετίζεται με αυξημένη σκλήρυνση(278). Έτσι η αυξημένη έκφραση της καθεψίνης S θα μπορούσε να θεωρηθεί πρόιμη εκδήλωση αγγειακής δυσλειτουργίας και αρτηριακής υπέρτασης. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες η αυξημένη έκφραση της καθεψίνης S συσχετίστηκε ανάλογα με την τιμή της κρεατινίνης και αντιστρόφως ανάλογα με τον ρυθμό της πειραματικής διήθησης (279). Η επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας φαίνεται να επιταχύνει την αγγειακή γήρανση όπως αυτό επιβεβαιώνεται από την μέτρηση της αρτηριακής σκληρίας (280-283). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διατριβής η αρτηριακή σκληρία σχετίζεται με την έκφραση της καθεψίνης S στον συνολικό πληθυσμό, συσχέτιση που φάνηκε ότι όχι μόνο διατηρείται στην πάροδο του χρόνου, αλλά εξελίσσεται, καθώς μετά από 3 έτη παρακολούθησης, οι ασθενείς με αυξημένη καθεψίνης S στην πρώτη επίσκεψη παρουσίαζαν ταχύτερο ρυθμό αύξησης της αρτηριακής σκληρίας, όπως αυτή εκτιμήθηκε από την PWV και το AI. Τα ευρήματα αυτά επεκτείνουν την υπάρχουσα γνώση της σχέσης της CTSS με την πρόοδο της αρτηριακής σκληρίας που είχε παρατηρηθεί σε ασθενείς με σοβαρή σταδίου 3 και 4 χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, και υποδεικνύουν ότι η σχέση αυτή μπορεί να ισχύει και σε ασθενείς υψηλού κινδύνου με ή χωρίς στεφανιαία νόσο (279). Νέες προοπτικές κλινικές μελέτες χρειάζονται για να εκτιμήσουν την κλινική αξία της CTSS ως βιοδείκτης πρόβλεψης αρτηριακής σκλήρυνσης και επιταχυνόμενης αγγειακής γήρανσης. Μηχανιστικά φαίνεται ότι η καθεψίνη S παίζει σημαντικό ρόλο στις αλλαγές του αρτηριακού τοιχώματος μέσω

της αποδόμησης της ελαστίνης και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα έδειξαν συσχέτιση της αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας (matrix) με την αγγειακή επασβέστωση (214,284-286) ενώ η αποδόμηση της ελαστίνης οδηγεί σε απώλεια της αρτηριακής ενδοτικότητας και προετοιμάζει το αρτηριακό τοίχωμα για επασβέστωση (287) απελευθερώνοντας θραύσματα πεπτιδίων που προκαλούν οστεογενετική απάντηση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων , ισχυροποιώντας έτσι τον ρόλο της καθεψίνης S στην αγγειακή νόσο. Έχει φανεί ότι η ελαστίνη δείγματος επασβεστωμένης αορτής είναι πιο επιρρεπής σε πρωτεόλυση από την μη επασβεστωμένη αορτή (288), δημιουργώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο όπου η αποδόμηση της ελαστίνης οδηγεί στην εναπόθεση ασβεστίου η οποία με τη σειρά της οδηγεί περαιτέρω σε αποδόμηση της ελαστίνης (288). Εκτεταμένη επασβέστωση έχει αποδειχθεί τόσο στην υπέρταση όπου η συνεχιζόμενη επασβέστωση των αγγείων οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της αρτηριακής υπέρτασης και επιδείνωση της εναπόθεσης ασβεστίου στα αγγεία όσο και στην νεφρική νόσο και στον σακχαρώδη διαβήτη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διατριβής αυξημένη έκφραση της καθεψίνης S συσχετίστηκε με τον σακχαρώδη διαβήτη. Αυτό επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες όπου τα επίπεδα πλάσματος της καθεψίνης S ήταν αυξημένα στους διαβητικούς ασθενείς σε σχέση με τους μη διαβητικούς (211) και υποστηρίζουν και την συμμετοχή της καθεψίνης S στα πολύ πρώιμα στάδια έναρξης του διαβήτη, στην απορρύθμιση της γλυκόζης και του μεταβολισμού της ινσουλίνης (289). Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού που προκαλεί μια χρόνια φλεγμονή, αντίσταση στην ινσουλίνη και διαβήτη(290).Ο ρόλος της καθεψίνης S σε αυτό είναι μέσω της απελευθέρωσης της από τα μακροφάγα (291) και της συμμετοχής της στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας (292), η οποία προκαλεί λιπογένεση και υπερτροφία των λιποκυττάρων (293). Αυτή η επέκταση του λιπώδους ιστού, πιθανώς μέσω της υποξίας που προκαλεί, συμβάλλει στην χαμηλού βαθμού φλεγμονή και την ινσουλινο-αντίσταση(294). Επιπλέον αυξημένα επίπεδα καθεψίνης S έχουν συνδεθεί τόσο με τις μακροαγγειακές επιπλοκές του ΣΔ, λόγω της ελαστολυτικής της δραστηριότητας (214, 219, 220,289,295), όσο και με τις μικροαγγειακές επιπλοκές, καθώς η καθεψίνη S φαίνεται να πυροδοτεί την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία ενεργοποιώντας τον υποδοχέα PAR2 (296) στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μια διαδικασία που ευνοεί επιπλοκές όπως η

διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η διαβητική νεφροπάθεια (297). Επιπλέον η αύξηση της έκφρασης της καθεψίνης S συσχετίστηκε με την αύξηση της CRP. Η CRP είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης που αυξάνεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως είναι η σήψη, η νέκρωση, το τραύμα και ο καρκίνος και μπορεί να αυξηθεί έως και 1000 φορές. Η καθεψίνη S έχει συσχετιστεί με την CRP και την IL-6 σε παχύσαρκες γυναίκες (298), καθώς και σε ηλικιωμένους άρρηνες (299). Από πειραματικά μοντέλα προκύπτει μια αιτιώδης σχέση μεταξύ της καθεψίνης S και της φλεγμονής καθώς η αναστολή της δραστηριότητας της καθεψίνης S μείωσε την φλεγμονή από τα T κύτταρα στο ΚΝΣ(300) και τα επίπεδα των κυτταροκινών (IL-6, TNF-α και ιντερφερόνη γ) στις κυψελίδες(301,302). Στον αντίποδα φαίνεται ότι και το αυξημένο φλεγμονώδες φορτίο αυξάνει τη καθεψίνη S καθώς προφλεγμονώδεις παράγοντες όπως η IL-6, ο TNF-α και η ιντερφερόνη γ αυξάνουν την δραστηριότητα της καθεψίνης S και την έκκρισή της στον λιπώδη ιστό (303), στα ώριμα μακροφάγα (304), στα δένδριτικά κύτταρα (305), στους πνεύμονες (306) και στις αθηρωματικές πλάκες (307). Όπως φαίνεται δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος μεταξύ της καθεψίνης S και της φλεγμονής. Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει τα αυξημένα επίπεδα της CRP με την καρδιαγγειακή νόσο υποστηρίζοντας το σημαντικό ρόλο που παίζει η φλεγμονή στον καρδιαγγειακό κίνδυνο (308-311). Η CRP είναι παρούσα στις αθηρωματικές πλάκες αλλά όχι στο φυσιολογικό αρτηριακό τοίχωμα ενισχύοντας τον ρόλο της CRP στα διάφορα στάδια της αθηρωμάτωσης. Επομένως υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που συσχετίζουν την CRP με την καθεψίνη S και την καρδιαγγειακή νόσο.

Εκτός από τις πρώιμες εκδηλώσεις της αθηροσκλήρυνσης σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διατριβής η έκφραση της καθεψίνης S φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην υποκλινική και κλινική αθηρωμάτωση και το αθηρωματικό φορτίο καθώς συσχετίστηκε με την παρουσία αθηρωματικών πλακών στις καρωτίδες και στις μηριαίες αρτηρίες, με την στεφανιαία νόσο, με τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών αλλά και με τον αριθμό των νοσούντων αρτηριακών δικτύων. Ο πληθυσμός που είχε αθηρωματικές πλάκες είτε στις καρωτίδες είτε στις μηριαίες είχε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης mRNA της καθεψίνης S. Δεδομένα από πολλές μελέτες υποστηρίζουν τον ρόλο που κατέχει η καθεψίνη S στα διάφορα στάδια της αθηροσκλήρυνσης, καθώς η έκφραση της αυξάνεται πολύ νωρίς μετά τον αγγειακό

τραυματισμό (205) και μέσω της διάσπασης της ελαστίνης και του κολλαγόνου (203,312), οδηγεί στην ανάπτυξη του νεκρωτικού πυρήνα (312) και την μετακίνηση των ΛΜΚ στον έσω χιτώνα (312,313). Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα υποστηρίζουν ότι η καθεψίνη S αυξάνει την απόπτωση (302,312) και είναι υπεύθυνη για την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων/μακροφάγων και την μετακίνηση τους στην πλάκα (314), ενώ όσον αφορά μελέτες *in vitro* η καθεψίνη S φαίνεται να αναστέλλει την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα(315) ευνοώντας περαιτέρω την ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον η καθεψίνη S μέσω της αποδόμησης της βασικής μεμβράνης του έσω χιτώνα των αρτηριών, δηλαδή του κολλαγόνου τύπου IV και I, της λαμινίνης και της ινονεκτίνης (316) διευκολύνει την είσοδο των λευκοκυττάρων στην αρχή της αθηρογένεσης (202), ενώ ένας ακόμα μηχανισμός μέσω του οποίου η καθεψίνη S διευκολύνει την αθηρογένεση είναι η νεοαγγειογένεση (203), καθώς μικροαγγεία επηρεάζουν την ανάπτυξη της πλάκας και την σταθερότητά της (317).

Η καθεψίνη S σχετίστηκε και με την εκδήλωση ΣΝ, καθώς ο πληθυσμός με γνωστή ΣΝ ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου είχε αυξημένη έκφραση καθεψίνης S σε σχέση με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ. Σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε κυρίως στον πληθυσμό με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου όταν αυτός συγκρίθηκε με τον πληθυσμό χωρίς κλινικά έκδηλη ΣΝ. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν την αύξηση της καθεψίνης S στην κλινικά έκδηλη καρδιαγγειακή νόσο όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, την ασταθή στηθάγχη και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (318). Επομένως φαίνεται ότι η καθεψίνη S εκτός από τον σχηματισμό αθηρωματικών πλακών, παίζει σημαντικό ρόλο και στην ευαλωτότητα των αθηρωματικών πλακών και στην ρήξη τους. Σε πειραματικά μοντέλα η έλλειψη της καθεψίνης S έδειξε εκτός από μείωση του μεγέθους των αθηρωματικών πλακών(203), μείωση και των ρήξεων (204), υποστηρίζοντας τον ρόλο της καθεψίνης S στην ευαλωτότητα της πλάκας και στην ρήξη, ενώ σε αθηρωματικές πλάκες ανθρώπων η ανοσοαπάντηση της καθεψίνης S φάνηκε να ανευρίσκεται κυρίως στην ινώδη κάψα και στις περιοχές της πλάκας(shoulder region) που γίνεται συνήθως η ρήξη και οι οποίες βρίθουν μακροφάγων (204). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της διατριβής, υψηλά επίπεδα καθεψίνης S πλάσματος έχουν βρεθεί σε ασθενείς με OEM , σταθερή ΣΝ και ασταθή στηθάγχη (318), ενώ σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη, η καθεψίνη

S πλάσματος συσχετίστηκε με τον αθηρογόνο υπότυπο της LDL φαινότυπο B, στον μόνο πληθυσμό που η θεραπεία με ατορβαστατίνη έδειξε μείωση της καθεψίνης S και βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ(319). Επιπλέον από τα αποτελέσματα της διατριβής η καθεψίνη S συσχετίστηκε με τον αριθμό των νοσούντων στεφανιαίων αρτηριών, δηλαδή η καθεψίνη S φαίνεται να σχετίζεται με την σοβαρότητα και την έκταση της ΣΝ. Υπέρ αυτού συνηγορούν προηγούμενες μελέτες όπου ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου που είχαν ολική έμφραξη του αγγείου με ανάσπαση του ST διαστήματος (STEMI) είχαν υψηλότερα επίπεδα καθεψίνης S από τους ασθενείς που είχαν ανοιχτό αγγείο(320), ενώ σε επίμυες που υπέστησαν OEM με ολική έμφραξη του προσθίου κατιόντα κλάδου, η έκφραση του mRNA της καθεψίνης S στα μυοκύτταρα, στους καρδιακούς ινοβλάστες και στα διηθημένα μακροφάγα της ισχαιμούσας περιοχής ήταν υψηλότερη σε σχέση με άλλων καθεψινών. Στην παρούσα διατριβή δεν βρέθηκε συσχέτιση της καθεψίνης S με την συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας του πληθυσμού με ΣΝ. Στην βιβλιογραφία, η έλλειψη της καθεψίνης S έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερης έκτασης έμφραγμα, λέπτυνση της περιοχής του εμφράγματος, μείωση της καρδιακής λειτουργίας και αύξηση των διαστάσεων της αριστερής κοιλίας, καθώς η καθεψίνη S πιθανώς να συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά από έμφραγμα, μέσω του ρόλου της στην μεταγωγή σήματος από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β (TGF-B), την διαφοροποίηση των ινοβλαστών και την σύνθεση των πρωτεϊνών (κολλαγόνου και ινονεκτίνης) στον εξωκυττάριο χώρο και έτσι στον σχηματισμό ουλής (321).

Σύγκριση καθεψίνης S και καθεψίνης B

Τόσο από τα αποτελέσματα της διατριβής όσο και από την βιβλιογραφία προκύπτει ότι και οι δύο καθεψίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρδιαγγειακή νόσο. Πολλές μελέτες συνδέουν την καθεψίνη B και S με τα καρδιαγγειακά νοσήματα, όμως οι μηχανισμοί με τους οποίους οι καθεψίνες εμπλέκονται σε αυτά δεν είναι απόλυτα σαφείς, ενώ άγνωστη παραμένει η πιθανή συσχέτιση και συνέργεια των δύο αυτών καθεψινών. Όπως προαναφέρθηκε, οι δύο καθεψίνες τοποθετούνται σε διαφορετικά χρωμοσώματα με την καθεψίνη B να ενεργεί ως διπεπτιδάση και να αποδομεί και να

τροποποιεί πρωτεΐνες όπως αλβουμίνη, κολλαγόνο τύπου IV, ινωδογόνο, ινονεκτίνη και IgG, να είναι ενεργή κυρίως σε όξινο περιβάλλον και να εκφράζεται κυρίως σε ανθρώπινους ιστούς και με την καθεψίνη S να ενεργεί ως εξωπεπτιδάση, να αποδομεί πρωτεΐνες όπως αλβουμίνη, κολλαγόνο, ελαστίνη, ινωδογόνο, λαμινίνη, MHC classII και πρωτεογλυκάνες (322), να είναι περισσότερο ενεργή σε ουδέτερο Ph και να εκφράζεται σε αντιγόνο παρουσιαστικά κύτταρα (216). Και οι δύο καθεψίνες συσχετίστηκαν με την παρουσία αθηρωματικών πλακών, ενώ ο ρόλος των ενζύμων αυτών στην αθηρογένεση υποστηρίζεται με την παρουσία αμφότερων των καθεψινών σε αθροσία σε αθηρωματικές πλάκες, καθώς και σε ασταθείς περιοχές αθηρωματικών πλακών (232,202), αλλά και στις πλάκες ποντικών με έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E (138). Και οι δύο καθεψίνες παρουσιάζουν έντονη καταβολική δραστηριότητα στην εξωκυττάρια ουσία *in vitro* και υπερεκφράζονται στα ενεργοποιημένα μακροφάγα και σε προχωρημένες αθηρωματικές βλάβες (292,323), καθώς η έκφραση του mRNA τους αυξάνεται σημαντικά στα M2 μακροφάγα, τα οποία βρίθουν στις ασταθείς πλάκες σε σχέση με τις σταθερές. Η δραστηριότητα αυτών των καθεψινών στα M2 μακροφάγα εκφράζεται κατά 5 φορές περισσότερο στις ασταθείς πλάκες ανθρώπων από ότι στις σταθερές (199). Επιπλέον η έκφραση της καθεψίνης S βρέθηκε ιδιαίτερα αυξημένη σε ασταθείς πλάκες σταδίου 3 ενώ η καθεψίνη B έχει βρεθεί αυξημένη σε ασταθείς πλάκες σταδίου 2 και 3, υποστηρίζοντας πιθανώς διαφορετικούς ρόλους των δύο καθεψινών στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης (199). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η καθεψίνη B φάνηκε να σχετίζεται ανεξάρτητα από διάφορους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου με την αρτηριακή σκληρία, ενώ το ίδιο δεν παρατηρήθηκε με την καθεψίνη S. Βέβαια ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι τα επίπεδα της καθεψίνης S σχετίζονται με την πρόοδο της αρτηριακής σκληρίας, ενώ το ίδιο δεν επιβεβαιώθηκε με την καθεψίνη B. Επιπλέον παρόλο που και οι δύο καθεψίνες συσχετίστηκαν με την έκταση της στεφανιαίας νόσου, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της καθεψίνης S φάνηκαν να σχετίζονται πιο ισχυρά με την πολυαγγειακή νόσο. Επίσης, σημαντικά αυξημένα ήταν τα επίπεδα έκφρασης της καθεψίνης S στον πληθυσμό με σταθερή ΣΝ και ακόμα περισσότερο στον πληθυσμό με OEM, σε αντίθεση με τα επίπεδα της καθεψίνης B που βρέθηκαν αυξημένα μόνο στο OEM συγκριτικά με τον πληθυσμό χωρίς ΣΝ. Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν την δράση των καθεψινών σε διαφορετικά

στάδια της νόσου, με την καθεψίνη B να απαντάται πιθανώς στα πιο πρώιμα στάδια της αγγειακής νόσου και στην αγγειακή γήρανση και την καθεψίνη S πιθανόν σε πιο προχωρημένα στάδια αθηρωμάτωσης και στην κλινική εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου.

Άγνωστο παραμένει εάν υπάρχει συνέργεια των δύο καθεψινών. Από την βιβλιογραφία αναφέρεται συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων της CTSB και της CTSS σε ασθενείς με ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (324). Ένας πιθανός μηχανισμός είναι μέσω της φλεγμονής και των κυτοκινών, καθώς οι καθεψίνες υπερεκφράζονται από κοινούς φλεγμονώδεις παράγοντες όπως ο TNF- α , η ιντερφερόνη γ και η ιντερλευκίνη 1β και όπως είναι γνωστό τα φλεγμονώδη κύτταρα βρίθουν στην αθηρωματικές πλάκες. Επιπλέον και οι ελεύθερες ρίζες αυξάνουν την έκφραση των καθεψινών(325).

7.2 Περιορισμοί

Η διατριβή διέπεται από ορισμένους περιορισμούς. Παρόλο σε όλες τις πολυπαραγοντικές αναλύσεις ετέθη υπόψιν το φύλο, ένας από τους περιορισμούς της διατριβής αφορά τον πληθυσμό με ΣΝ, ο οποίος αποτελείται κυρίως από άντρες. Η αναλογία αυτή είναι εν μέρει αναμενόμενη δεδομένου ότι η ΣΝ είναι πιο συχνά έκδηλη στο ανδρικό φύλο (326). Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι γυναίκες παρόλο που έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης μυοκαρδιακής ισχαιμίας από τους άντρες, λιγότερο συχνά αυτή θα εκδηλωθεί με τα τυπικά συμπτώματα του OEM ή με αποφρακτική στεφανιαία νόσο(326,327). Ακόμη, ο αριθμός των ασθενών στον οποίο μετρήθηκε η CTSS είναι σχετικά περιορισμένος, κάτι το οποίο δεν επέτρεψε την αξιολόγηση συσχετίσεων με το συνδυασμό των 2 καθεψινών. Επιπλέον, για λογιστικούς λόγους δεν ήταν δυνατόν να μετρηθούν τα επίπεδα καθεψινών στο αίμα ώστε να συνεκτιμηθεί με την έκφραση του mRNA των καθεψινών. Αυτό δεν επιτρέπει να εξετάσουμε συγκριτικά τα αποτελέσματα της διατριβής με αντίστοιχες μελέτες που έχουν αξιολογήσει την πρωτεΐνη πλάσματος των καθεψινών. Βέβαια γνωστό είναι ότι δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση του mRNA και της πρωτεΐνης, καθώς οι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί που μετατρέπουν το mRNA σε πρωτεΐνη ρυθμίζονται διαφορετικά από την δραστηριότητα του γονιδίου (328) και η ποσότητα

πρωτεΐνης που παράγει από κάθε mRNA επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που καθορίζονται από την πρωταρχική ακολουθία των αμινοξέων (329). Επιπλέον και ο χρόνος ημίσειας ζωής των πρωτεϊνών διαφέρει σημαντικά από τον χρόνο ημίσειας ζωής του mRNA(330). Τέλος, λόγω μικρού αριθμού παρατηρήσεων δεν διενεργήθηκε ανάλυση επιβίωσης για την CTSS όπως επίσης και πολυπαραγοντική ανάλυση ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των δύο καθεψινών ως προς τον κίνδυνο εμφάνιση μελλοντικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων.

7.3 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η αυξημένη έκφραση της καθεψίνης B και της καθεψίνης S σχετίζεται με παράγοντες που επιταχύνουν την αγγειακή γήρανση όπως η αρτηριακή σκληρία, η αρτηριακή υπέρταση και ο μειωμένος ρυθμός σπειραματικής διήθησης . Επιπλέον αυξημένα επίπεδα έκφρασης και των δύο καθεψινών φαίνεται να σχετίζονται με την παρουσία και την έκταση της περιφερικής αθηροσκλήρυνσης και της κλινικά έκδηλης στεφανιαίας νόσου. Η καθεψίνη S φαίνεται να συμμετέχει στην πρόοδο της αρτηριακής σκληρίας, ενώ τα επίπεδα της καθεψίνης B συσχετίστηκαν με μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν τον ενεργό ρόλο της καθεψίνης B και της καθεψίνης S στην αγγειακή γήρανση και στην αθηροσκλήρυνση, που μέσω αυτών των μηχανισμών θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην ανάπτυξη της κλινικά έκδηλης καρδιαγγειακής νόσου. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την περαιτέρω μελέτη της κλινικής αξίας των καθεψινών ως διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών στην καρδιαγγειακή νόσο. Επιπλέον δεδομένου ότι ήδη έχουν αναπτυχθεί θεραπευτικοί αναστολείς των καθεψινών και έχουν δοκιμαστεί στον άνθρωπο σε άλλα νοσήματα, τα αποτελέσματα της διατριβής ενισχύουν την πιθανή αξία τους ως θεραπευτικοί στόχοι στην καρδιαγγειακή νόσο. Καθώς το βασικό χαρακτηριστικό της επιστημονικής γνώσης παραμένει η περιοδική αναθεώρηση, ευελπιστούμε τα ευρήματα και τα συμπεράσματα που παρατέθηκαν να συμβάλλουν μελλοντικά στην πρόωμη διάγνωση της καρδιαγγειακής νόσου και να αποτελέσουν το υπόστρωμα για τη διατύπωση μελλοντικών ερευνητικών υποθέσεων

με κύριο γνώμονα την αναστολή της εξέλιξης ή και την αναστροφή της αθηρωματικής νόσου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2017 Sep 5;136(10): e196.
2. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):535-46.
3. Palinski W, Napoli C. Pathophysiological events during pregnancy influence the development of atherosclerosis in humans. *Trends Cardiovasc Med*. 1999 Oct;9(7):205-14.
4. Sary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesion: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5):1177-8.
5. Sary HC. Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*. 1987 Apr;64(2-3):91-108.
6. Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis*. 1989 Jan-Feb;9(1 Suppl):119-32.
7. Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994 May;89(5):2462-78.
8. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74.
9. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014 Jun 6;114(12):1852-66.

10. Pepine CJ. Systemic hypertension and coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1998 Aug 6;82(3A):21H-24H.
11. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997 Aug;30(2):325-33.
12. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Lüscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation.* 1996 Aug 1;94(3):258-65.
13. Cohen RA. The Role of Nitric Oxide and Other Endothelium-derived Vasoactive Substances in Vascular Disease. *Progress in Cardiovascular diseases* 1995;38:105-128.
14. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: New insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 1998;105:S32-9.
15. Goode TB, Davies PF, Reidy MA, Bowyer DE. Aortic endothelial cell morphology observed in situ by scanning electron microscopy during atherogenesis in rabbit. *Atherosclerosis* 1997;27:235-51.
16. Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 1997;101:1780-4.
17. Clakson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RM. Endothelial-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation* 1997;96:3378-83.
18. Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JMcB. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:833-43.
19. Verbeuren TJ, Joordaens FH, Zonnekeyn LL, Van Hove CE, Coene MC. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity on the rabbit. I. Endothelium-

- dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* 1986;58:552-564.
20. Cohen RA, Vanhoutte P. Endothelium dependent Hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995;92:3337-3349.
 21. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1468-74.
 22. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:471-6.
 23. Gilligan DM, Badar DM, Panza JA, Quyyumi AA, Cannon RO. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* 1994;90:786-91.
 24. Gilligan DM, Guetta V, Panza JA, Garcia CE, Quyyumi AA. Selective Loss of Microvascular Endothelial Function in Human Hypercholesterolemia. *Circulation* 1994;90:35-41.
 25. Johnstone MT. Impaired Endothelium-dependent vasodilation in patients with Insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993;88:2510-6.
 26. McVeigh GE, Lemay L, Morgan D, Cohn JN. Effects of long-term cigarette smoking on endothelium-dependent responses in humans. *Am J Cardiol* 1996;78:668-672.
 27. Panza JA, Quyyumi AA, Callahan TS. Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:1145-1151.
 28. Sorensen KE, Dorup I, Hermann AP, Mosekilde L. Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function. 1998;*Circulation* 97:1234-8.
 29. Williams SB. Impaired Nitric Oxide-mediated vasodilation in patients with Non-insulin dependent Diabetes Mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:567-74.
 30. Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Transient impairment of endothelium-dependent brachial artery reactivity following a fatty meal. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:287A, Abstract.

31. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, Nanas J, Kontoyannis D. Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals. *Am J Cardiol* 1997;79:529–31.
32. Wentzel JJ, Chatzizisis YS, Gijsen FJ, Giannoglou GD, Feldman CL, Stone PH. Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions. *Cardiovasc Res*. 2012 Nov 1;96(2):234-43.
33. Slager CJ, Wentzel JJ, Gijsen FJ, Thury A, van der Wal AC, Schaar JA, Serruys PW. The role of shear stress in the destabilization of vulnerable plaques and related therapeutic implications. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005 Sep;2(9):456-64.
34. Leitinger N, Schulman IG. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jun;33(6):1120-6.
35. Miteva K, Madonna R, De Caterina R, Van Linthout S. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2018 Apr 22. pii: S1537-1891(17)30464-0.
36. Dalager S, Paaske WP, Kristensen IB, Laurberg JM, Falk E. Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke*. 2007 Oct;38(10):2698-705. Epub 2007 Aug 30.
37. Nie X, Randolph GJ, Elvington A, Bandara N, Zheleznyak A, Gropler RJ, Woodard PK, Lapi SE. Imaging of hypoxia in mouse atherosclerotic plaques with (64)Cu-ATSM. *Nucl Med Biol*. 2016 Sep;43(9):534-542.
38. Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens AP, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, Duimel H, Frederik PM, van Hinsbergh VW, Virmani R, Daemen MJ. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 28;53(17):1517-27.
39. Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J*. 1983 Aug;50(2):127-34.

40. Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol.* 1981 May;89(2):379-83.
41. Atsushi Shioi, Yuji Ikari. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression *J Atheroscler Thromb.* 2018 Apr 1; 25(4): 294–303.
42. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation.* 2000 Sep 5;102(10):1186-91.
43. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med.* 1997 May 1;336(18):1276-82.
44. Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994 Jan;89(1):36-44.
45. Mittleman MA, Mostofsky E. Physical, psychological and chemical triggers of acute cardiovascular events: preventive strategies. *Circulation.* 2011 Jul 19;124(3):346-54.
46. Jia H, Dai J, Hou J, Xing L, Ma L, Liu H, Xu M, Yao Y, Hu S, Yamamoto E, Lee H, Zhang S, Yu B, Jang IK. Effective anti-thrombotic therapy without stenting: intravascular optical coherence tomography-based management in plaque erosion (the EROSION study). *Eur Heart J.* 2017 Mar 14;38(11):792-800.
47. Lokeshwar VB, Selzer MG. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):27641-9.
48. Koshiishi I, Shizari M, Underhill CB. CD44 can mediate the adhesion of platelets to hyaluronan. *Blood.* 1994 Jul 15;84(2):390-6.
49. Yvonne Döring, Oliver Soehnlein, Christian Weber Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ Res* 2017 Feb 17;120(4):736-743.
50. Kazuyuki Yahagi, Frank D Kolodgie, Christoph Lutter, Hiroyoshi Mori, Maria E Romero, Alope V Finn, Renu Virmani Pathology of Human Coronary

and Carotid Artery Atherosclerosis and Vascular Calcification in Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017 Feb;37(2):191-204.

51. R Virmani , F D Kolodgie, A P Burke, A Farb, S M Schwartz . Lessons From Sudden Coronary Death: A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5):1262-75.
52. Yung-Chih Chen, Alex L. Huang, Tin S. Kyaw, Alex Bobik, and Karlheinz Peter Atherosclerotic Plaque Rupture. Identifying the Straw That Breaks the Camel's Back. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2016;36:e63–e72
53. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, de Bruyne B, Cristea E, Mintz GS, Mehran R, McPherson J, Farhat N, Marso SP, Parise H, Templin B, White R, Zhang Z, Serruys PW. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. PROSPECT Investigators. *N Engl J Med*. 2011 Jan 20;364(3):226-35.
54. Edward G Lakatta , Daniel Levy. Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part I: Aging Arteries: A "Set Up" for Vascular Disease Circulation. 2003 Jan 7;107(1):139-46.
55. Laina A, Stellos K, Stamatelopoulos K. Vascular ageing: Underlying mechanisms and clinical implications. *Exp Gerontol*. 2018 Aug;109:16-30.
56. B Jani and C Rajkumar. Ageing and vascular ageing. *Postgrad Med J*. 2006 Jun; 82(968): 357–362.
57. Bernd Niemann , Ying Chen, Mirja Teschner, Ling Li, Rolf-Edgar Silber, Susanne Rohrbach. Obesity Induces Signs of Premature Cardiac Aging in Younger Patients: The Role of Mitochondria. *J Am Coll Cardiol* .2011 Feb 1;57(5):577-85.
58. Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, Robinowitz M, Herderick EE, Cornhill JF, Guo SY, Liu TH, Ou DY, O'Rourke M. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis: comparison between occidental and Chinese communities. *Am J Pathol*. 1991; 139: 1119–1129.
59. Julie C Wang , Martin Bennett. Aging and Atherosclerosis: Mechanisms, Functional Consequences, and Potential Therapeutics for Cellular Senescence. *Circ Res*. 2012 Jul 6;111(2):245-59.

60. João L Cavalcante , João A C Lima, Alban Redheuil, Mouaz H Al-Mallah. Aortic Stiffness: Current Understanding and Future Directions. *J Am Coll Cardiol* . 2011 Apr 5;57(14):1511-22.
61. Joseph L Izzo Jr Arterial Stiffness and the Systolic Hypertension Syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 2004 Jul;19(4):341-52.
62. G M London , A P Guerin. Influence of Arterial Pulse and Reflected Waves on Blood Pressure and Cardiac Function. *Am Heart J*. 1999 Sep;138(3 Pt 2):220-4.
63. J Blacher , A P Guerin, B Pannier, S J Marchais, M E Safar, G M London. Impact of Aortic Stiffness on Survival in End-Stage Renal Disease. *Circulation*. 1999 May 11;99(18):2434-9.
64. Michel E Safar , Bernard I Levy, Harry Struijker-Boudier , Current Perspectives on Arterial Stiffness and Pulse Pressure in Hypertension and Cardiovascular Diseases. *Circulation*. 2003 Jun 10;107(22):2864-9.
65. Wilmer W Nichols , Scott J Denardo, Ian B Wilkinson, Carmel M McEniery, John Cockcroft, Michael F O'Rourke. Effects of Arterial Stiffness, Pulse Wave Velocity, and Wave Reflections on the Central Aortic Pressure Waveform. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2008 Apr;10(4):295-303.
66. Stamatelopoulos K, Sibbing D, Rallidis LS, Georgiopoulos G, Stakos D, Braun S, et al. Amyloid- beta (1-40) and the risk of death from cardiovascular causes in patients with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(9):904-16.
67. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2588-605.
68. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, O'Rourke MF, Safar ME, Baou K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with central haemodynamics: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J*. 2010;31(15):1865-71.
69. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(13):1318-27.
70. Zhou B, Margariti A, Zeng L, Xu Q. Role of histone deacetylases in vascular cell homeostasis and arteriosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2011;90(3):413-20.

71. Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(37):14855-60.
72. Donato AJ, Magerko KA, Lawson BR, Durrant JR, Lesniewski LA, Seals DR. SIRT-1 and vascular endothelial dysfunction with ageing in mice and humans. *J Physiol*. 2011;589(Pt 18):4545-54.
73. Zarzuelo MJ, Lopez-Sepulveda R, Sanchez M, Romero M, Gomez-Guzman M, Ungvary Z, et al. SIRT1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: implications for vascular aging. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(9):1288-96.
74. Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y. Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(5):571-9.
75. Breitenstein A, Stein S, Holy EW, Camici GG, Lohmann C, Akhmedov A, et al. Sirt1 inhibition promotes in vivo arterial thrombosis and tissue factor expression in stimulated cells. *Cardiovasc Res*. 2011;89(2):464-72.74.
76. Stein S, Schafer N, Breitenstein A, Besler C, Winnik S, Lohmann C, et al. SIRT1 reduces endothelial activation without affecting vascular function in ApoE^{-/-} mice. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(6):353-60.
77. Breitenstein A, Wyss CA, Spescha RD, Franzeck FC, Hof D, Riwanto M, et al. Peripheral blood monocyte Sirt1 expression is reduced in patients with coronary artery disease. *PLoS One*. 2013;8(1):e53106
78. Kedenko L, Lamina C, Kedenko I, Kollerits B, Kiesslich T, Iglseder B, et al. Genetic polymorphisms at SIRT1 and FOXO1 are associated with carotid atherosclerosis in the SAPHIR cohort. *BMC Med Genet*. 2014;15:112.
79. Li L, Zhang HN, Chen HZ, Gao P, Zhu LH, Li HL, et al. SIRT1 acts as a modulator of neointima formation following vascular injury in mice. *Circ Res*. 2011;108(10):1180-9.
80. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):611-22.
81. Serrano AL, Andrés V. Telomeres and Cardiovascular Disease. Does Size Matter? 2004;94(5):575- 84.

82. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*. 2003;361(9355):393-5.
83. Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(24):11190-4.
84. Bennaceur K, Atwill M, Al Zhrany N, Hoffmann J, Keavney B, Breault D, et al. Atorvastatin induces T cell proliferation by a telomerase reverse transcriptase (TERT) mediated mechanism. *Atherosclerosis*. 2014;236(2):312-20.
85. Fyhrquist F, Saijonmaa O, Strandberg T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(5):274-83.
86. Spyridopoulos I, Hoffmann J, Aicher A, Brummendorf TH, Doerr HW, Zeiher AM, et al. Accelerated telomere shortening in leukocyte subpopulations of patients with coronary heart disease: role of cytomegalovirus seropositivity. *Circulation*. 2009;120(14):1364-72.
87. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ : British Medical Journal*. 2014;349.
88. Varga R, Eriksson M, Erdos MR, Olive M, Harten I, Kolodgie F, et al. Progressive vascular smooth muscle cell defects in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(9):3250-5
89. Olive M, Harten I, Mitchell R, Beers JK, Djabali K, Cao K, et al. Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(11):2301-9.
90. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45-51.
91. Gao D, Zuo Z, Tian J, Ali Q, Lin Y, Lei H, et al. Activation of SIRT1 Attenuates *Klotho* Deficiency- Induced Arterial Stiffness and Hypertension by Enhancing AMP-Activated Protein Kinase Activity. *Hypertension*. 2016;68(5):1191-9.

92. Vaitkevicius PV, Fleg JL, Engel JH, O'Connor FC, Wright JG, Lakatta LE, et al. Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation*. 1993;88(4 Pt 1):1456-62.
93. Avolio AP, Chen SG, Wang RP, Zhang CL, Li MF, O'Rourke MF. Effects of aging on changing arterial compliance and left ventricular load in a northern Chinese urban community. *Circulation*. 1983;68(1):50-8.
94. Kelly R, Hayward C, Avolio A, O'Rourke M. Noninvasive determination of age-related changes in the human arterial pulse. *Circulation*. 1989;80(6):1652-9.
95. AlGhatrif M, Strait JB, Morrell CH, Canepa M, Wright J, Elango P, et al. Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension*. 2013;62(5):934-41.
96. Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, et al. Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2004;43(6):1239-45.
97. Vaitkevicius PV, Fleg JL, Engel JH, O'Connor FC, Wright JG, Lakatta LE, et al. Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation*. 1993;88(4 Pt 1):1456-62.
98. AlGhatrif M, Strait JB, Morrell CH, Canepa M, Wright J, Elango P, et al. Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension*. 2013;62(5):934-41.
99. McDonnell BJ, Yasmin, Butcher L, Cockcroft JR, Wilkinson IB, Erusalimsky JD, et al. The age-dependent association between aortic pulse wave velocity and telomere length. *J Physiol*. 2017;595(5):1627-35.
100. Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, et al. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension*. 2001;37(2 Pt 2):381-5.
101. Wang YY, Chen AF, Wang HZ, Xie LY, Sui KX, Zhang QY. Association of shorter mean telomere length with large artery stiffness in patients with coronary heart disease. *Aging Male*. 2011;14(1):27-32.
102. Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith ACM, Perry MB, et al. Phenotype and Course of Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(6):592-604.

103. Olive M, Harten I, Mitchell R, Beers JK, Djabali K, Cao K, et al. Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(11):2301-9.
104. James J. Oliver, David J. Webb Noninvasive Assessment of Arterial Stiffness and Risk of Atherosclerotic Events *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:554-566.
105. Michiel L. Bots, Joke M. Dijk, Anath Oren and Diederick E. Grobbee. Carotid intima-media thickness, arterial stiffness and risk of cardiovascular disease: current evidence *Journal of Hypertension* 2002;20:2317-2325.
106. Nichols WW, O'Rourke MF (editors): McDonald's blood flow in arteries. In: *Theoretical, experimental and clinical principles.* Oxford: Oxford University Press, 1998.
107. Wenn CM, Newman DL. Arterial tortuosity. *Australas Phys Eng Sci Med* 1990;13:67-70. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Oct;17(10):1713-24.
108. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, Adda H. Arterial structure and function in end-stage renal disease. *Dial Transpl* 2002;(10):1713-24.
109. Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H: Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation* 2003;107:2864-2869.
110. Chen CH, Nevo E, Fetcs B, Pak PH, Yin FC, Maughan WL, Kass DA. Estimation of central aortic pressure waveform by mathematical transformation of radial tonometry pressure: validation of generalized transfer function. *Circulation* 1997;95:1827-1836.
111. Hope SA, Tay DB, Meredith IT, Cameron JD. Comparison of generalized and gender-specific transfer functions for the derivation of aortic waveforms. *Am J Physiol* 2002;283:H1150-1156.
112. Kelly RP, Millasseau SC, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Vasoactive drugs influence aortic augmentation index independently of pulse-wave velocity in healthy men. *Hypertension* 2001;37:1429-1433.
113. Watt TB, Jr, Burrus CS. Arterial pressure contour analysis for estimating human vascular properties. *J Appl Physiol* 1976;40:171-176.

114. Cohn JN, Finkelstein S, McVeigh G, Morgan D, LeMay L, Robinson J, Mock J. Noninvasive pulse wave analysis for the early detection of vascular disease. *Hypertension* 1995;26:503–508.
115. McVeigh GE, Bratteli CW, Morgan DJ, Alinder CM, Glasser SP, Finkelstein SM, Cohn JN. Age-related abnormalities in arterial compliance identified by pressure pulse contour analysis: aging and arterial compliance. *Hypertension* 1999;33(6):1392-8.
116. Laurent S, Caviezel B, Beck L, Girerd X, Billaud E, Boutouyrie P, Hoeks A, Safar M. Carotid artery distensibility and distending pressure in hypertensive humans. *Hypertension*. 1994;23:878–883.
117. Martin Flamant, Sandrine Placier, Caroline Dubroca, Bruno Esposito, Izolina Lopes, Christos Chatziantoniou, Alain Tedgui, Jean-Claude Dussaule, Stéphanie Lehoux. Sixth International Workshop on Structure and Function of the Vascular System: Role of Matrix Metalloproteinases in Early Hypertensive Vascular Remodeling. *Hypertension* 2007; 50: 212-218.
118. Boris Turk. Targeting Proteases: Successes, Failures and Future Prospects *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Sep;5(9):785-99.
119. Carlos López-Otín, Lynn M Matrisian. Emerging Roles of Proteases in Tumour Suppression. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):800-8.
120. Jessica R Lowry, Andis Klegeris. Emerging Roles of Microglial Cathepsins in Neurodegenerative Disease *Brain Res Bull*. 2018 May;139:144-156.
121. Vito Turk, Veronika Stoka, Olga Vasiljeva, Miha Renko, Tao Sun, Boris Turk, Dušan Turk. Cysteine Cathepsins: From Structure, Function and Regulation to New Frontiers. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1824(1):68-88.
122. Yuhei Mizunoe, Yuka Sudo, Naoyuki Okita, Hidenori Hiraoka, Kentaro Mikami, Tomohiro Narahara, Arisa Negishi, Miki Yoshida, Rikako Higashibata, Shukoh Watanabe, Hiroki Kaneko, Daiki Natori, Takuma Furuichi, Hiromine Yasukawa, Masaki Kobayashi, Yoshikazu Higami. Involvement of Lysosomal Dysfunction in Autophagosome Accumulation and Early Pathologies in Adipose Tissue of Obese Mice. *Autophagy*. 2017 Apr 3;13(4):642-653.

123. Seema Patel , Ahmad Homaei , Hesham R El-Seedi , Nadeem Akhtar .
Cathepsins: Proteases That Are Vital for Survival but Can Also Be Fatal. *Biomed Pharmacother.* 2018 Sep;105:526-532.
124. K C Baker , M A Taylor, N J Cummings, M A Tuñón, K A Worboys, I F Connerton. Autocatalytic Processing of Pro-Papaya Proteinase IV Is Prevented by Crowding of the Active-Site Cleft. *Protein Eng.* 1996 Jun;9(6):525-9.
125. Eva Vidak , Urban Javoršek , Matej Vizovišek , Boris Turk Cysteine Cathepsins and Their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells.* 2019 Mar 20;8(3):264.
126. Silvia Jordans , Sasa Jenko-Kokalj, Nicole M Kühl, Sofia Tedelind, Wolfgang Sendt, Dieter Brömme, Dusan Turk, Klaudia Brix. Monitoring Compartment-Specific Substrate Cleavage by Cathepsins B, K, L, and S at Physiological pH and Redox Conditions. *BMC Biochem.* 2009 Sep 22;10:23.
127. Oakley C Olson , Johanna A Joyce Cysteine Cathepsin Proteases: Regulators of Cancer Progression and Therapeutic Response. *Nat Rev Cancer.* 2015 Dec;15(12):712-29.
128. Dejan Caglic , Jerica Rozman Pungercar, Gunnar Pejler, Vito Turk, Boris Turk. Glycosaminoglycans Facilitate Procathepsin B Activation Through Disruption of Propeptide-Mature Enzyme Interactions. *J Biol Chem.* 2007 Nov 9;282(45):33076-85.
129. Mona Mostafa Mohamed , Bonnie F Sloane. Cysteine Cathepsins: Multifunctional Enzymes in Cancer. *Nat Rev Cancer* 2006 Oct;6(10):764-75.
130. Morteza Naghavi , Reji John, Sameh Naguib, Mir Said Siadaty, Roxana Grasu, K C Kurian, W Barry van Winkle, Babs Soller, Silvio Litovsky, Mohammad Madjid, James T Willerson, Ward Casscells. pH Heterogeneity of Human and Rabbit Atherosclerotic Plaques; A New Insight Into Detection of Vulnerable Plaque. *Atherosclerosis.* 2002 Sep;164(1):27-35.
131. Vasilena Gocheva , Johanna A Joyce Cysteine Cathepsins and the Cutting Edge of Cancer Invasion. *Cell Cycle.* 2007 Jan 1;6(1):60-4.
132. Johanna A Joyce , Douglas Hanahan. Multiple Roles for Cysteine Cathepsins in Cancer. *Cell Cycle.* 2004 Dec;3(12):1516-619.

133. Gong-Jun Tan, Zheng-Ke Peng, Jin-Ping Lu, and Fa-Qing Tang Cathepsins mediate tumor metastasis *World J Biol Chem.* 2013 Nov 26; 4(4): 91–101.
134. Salpeter SJ, Pozniak Y, Merquiol E, Ben-Nun Y, Geiger T, Blum G. A novel cysteine cathepsin inhibitor yields macrophage cell death and mammary tumor regression. *Oncogene* 2015
135. Veronika Stoka, Vito Turk, Boris Turk. Lysosomal Cathepsins and Their Regulation in Aging and Neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2016 Dec;32:22-37.
136. G P Shi, G K Sukhova, A Grubb, A Ducharme, L H Rhode, R T Lee, P M Ridker, P Libby, H A Chapman. Cystatin C Deficiency in Human Atherosclerosis and Aortic Aneurysms. *J Clin Invest.* 1999 Nov;104(9):1191-7.
137. Jian Liu, Galina K Sukhova, Jin-Tian Yang, Jiusong Sun, Likun Ma, An Ren, Wei-Hua Xu, Huanxiang Fu, Gregory M Dolganov, Chengcheng Hu, Peter Libby, Guo-Ping Shi. Cathepsin L Expression and Regulation in Human Abdominal Aortic Aneurysm, Atherosclerosis, and Vascular Cells. *Atherosclerosis.* 2006 Feb;184(2):302-11
138. Sofia Jormsjö, Dirk M Wuttge, Allan Sirsjö, Carl Whatling, Anders Hamsten, Sten Stemme, Per Eriksson. Differential Expression of Cysteine and Aspartic Proteases During Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient Mice. *Am J Pathol.* 2002 Sep;161(3):939-45.
139. Konstantinos Stellos, Aikaterini Gatsiou, Kimon Stamatelopoulos, Ljubica Perisic Matic, David John, Federica Francesca Lunella, Nicolas Jaé, Oliver Rossbach, Carolin Amrhein, Frangiska Sigala, Reinier A Boon, Boris Fürtig, Yosif Manavski, Xintian You, Shizuka Uchida, Till Keller, Jes-Niels Boeckel, Anders Franco-Cereceda, Lars Maegdefessel, Wei Chen, Harald Schwalbe, Albrecht Bindereif, Per Eriksson, Ulf Hedin, Andreas M Zeiher, Stefanie Dimmeler. Adenosine-to-inosine RNA Editing Controls Cathepsin S Expression in Atherosclerosis by Enabling HuR-mediated Post-Transcriptional Regulation. *Nat Med.* 2016 Oct;22(10):1140-1150.
140. V Turk, B Turk, D Turk. Lysosomal Cysteine Proteases: Facts and Opportunities. *EMBO J.* 2001 Sep 3;20(17):4629-33.
141. D Turk, V Janjić, I Stern, M Podobnik, D Lamba, S W Dahl, C Lauritzen, J Pedersen, V Turk, B Turk. Structure of Human Dipeptidyl Peptidase I (Cathepsin C):

Exclusion Domain Added to an Endopeptidase Framework Creates the Machine for Activation of Granular Serine Proteases. *EMBO J.* 2001 Dec 3;20(23):6570-82.

142. Brice Korkmaz, George H Caughey, Iain Chapple, Francis Gauthier, Josefine Hirschfeld, Dieter E Jenne, Ralph Kettritz, Gilles Lalmanach, Anne-Sophie Lamort, Conni Lauritzen, Monika Łęgowska, Adam Lesner, Sylvain Marchand-Adam, Sarah J McKaig, Celia Moss, John Pedersen, Helen Roberts, Adrian Schreiber, Seda Seren, Nalin S Thakker. Therapeutic Targeting of Cathepsin C: From Pathophysiology to Treatment. *Pharmacol Ther.* 2018 Oct;190:202-236.
143. John R Somoza, James T Palmer, Joseph D Ho. The Crystal Structure of Human Cathepsin F and Its Implications for the Development of Novel Immunomodulators. *J Mol Biol* 2002 Sep 20;322(3):559-68.
144. Ce Ji, Ying Zhao, You-Wei Kou, Hua Shao, Lin Guo, Chen-Hui Bao, Ben-Chun Jiang, Xin-Ying Chen, Jing-Wei Dai, Yu-Xin Tong, Ren Yang, Wei Sun, Qiang Wang. Cathepsin F Knockdown Induces Proliferation and Inhibits Apoptosis in Gastric Cancer Cells. *Oncol Res.* 2018 Jan 19;26(1):83-93.
145. Takahashi T., Dehdarani A. H., Tang J.(1988) Porcine spleen cathepsin H hydrolyzes oligopeptides solely by aminopeptidase activity. *J. Biol. Chem.* 263, 10952–10957
146. E C del Re, S Shuja, J Cai, M J Murnane. Alterations in cathepsin H activity and protein patterns in human colorectal carcinomas. *Br J Cancer.* 2000 Apr; 82(7): 1317–1326.
147. Anuradha Waghray, Daniel Keppler, Bonnie F Sloane, Lucia Schuger, Yong Q Chen. Analysis of a Truncated Form of Cathepsin H in Human Prostate Tumor Cells. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):11533-8.
148. Kos J, Štabuc B, Schweiger A, Krašovec M, Cimerman N, Kopitar-Jerala N and Vrhovec I (1997) Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 3: 1815–1822
149. Sivaparvathi M, Sawaya R, Gokaslan ZL, Rao JS and Chintala SK (1996) Expression and the role of cathepsin H in human glioma progression and invasion. *Cancer Lett* 107: 161–167

150. B D Gelb , G P Shi, M Heller, S Weremowicz, C Morton, R J Desnick, H A Chapman. Structure and Chromosomal Assignment of the Human Cathepsin K Gene. *Genomics*. 1997 Apr 15;41(2):258-62.
151. Aline G. Costa, Natalie E. Cusano, Barbara C. Silva, Serge Cremers & John P. Bilezikian. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis *Nature Reviews Rheumatology* volume 7, pages447–456(2011)
152. Matthew T Drake, Bart L Clarke, Merry Jo Oursler, Sundeep Khosla. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. *Endocr Rev*. 2017 Aug 1;38(4):325-350.
153. Jiusong Sun, Galina K Sukhova, Jie Zhang, Han Chen, Sara Sjöberg, Peter Libby, Meixiang Xiang, Jianan Wang, Christoph Peters, Thomas Reinheckel, Guo-Ping Shi. Cathepsin L Activity Is Essential to Elastase Perfusion-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Nov;31(11):2500-8.
154. Xian Wu Cheng, Zhe Huang, Masafumi Kuzuya, Kenji Okumura, Toyooki Murohara. Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerosis-Based Vascular Disease and Its Complications. *Hypertension*. 2011 Dec;58(6):978-86.
155. Wei Li, Louise Kornmark, Lena Jonasson, Claes Forssell, Xi-Ming Yuan. Cathepsin L Is Significantly Associated With Apoptosis and Plaque Destabilization in Human Atherosclerosis. *Atherosclerosis* . 2009 Jan;202(1):92-102.
156. Jingjing Cai, Hua Zhong, Jinze Wu, Rui-Fang Chen, Huan Yang, Yousef Al-Abed, Ying Li, Xiaohui Li, Weihong Jiang, Marcelo Freitas Montenegro, Hong Yuan, Timothy Billiar, Alex F Chen. Cathepsin L Promotes Vascular Intimal Hyperplasia After Arterial Injury. *Mol Med*. 2017 Jun;23:92-100.
157. Dhivya R. Sudhan, Dietmar W. Siemann. Cathepsin L targeting in cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2015 Nov; 155: 105–116.
158. S S Chauhan, N C Popescu, D Ray, R Fleischmann, M M Gottesman, B R Troen. Cloning, Genomic Organization, and Chromosomal Localization of Human Cathepsin L. *J Biol Chem*. 1993 Jan 15;268(2):1039-45.
159. I Santamaría, G Velasco, M Cazorla, A Fueyo, E Campo, C López-Otín. Cathepsin L2, a Novel Human Cysteine Proteinase Produced by Breast and Colorectal Carcinomas. *Cancer Res*. 1998 Apr 15;58(8):1624-30.

160. W Adachi , S Kawamoto, I Ohno, K Nishida, S Kinoshita, K Matsubara, K Okubo. Isolation and Characterization of Human Cathepsin V: A Major Proteinase in Corneal Epithem. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Sep;39(10):1789-96.
161. I Santamaría , A M Pendás, G Velasco, C López-Otín Genomic Structure and Chromosomal Localization of the Human Cathepsin O Gene (CTSO). *Genomics.* 1998 Oct 15;53(2):231-4.
162. G Velasco , A A Ferrando, X S Puente, L M Sánchez, C López-Otín. Human Cathepsin O. Molecular Cloning From a Breast Carcinoma, Production of the Active Enzyme in *Escherichia Coli*, and Expression Analysis in Human Tissues. *J Biol Chem.* 1994 Oct 28;269(43):27136-42.
163. G P Shi , H A Chapman, S M Bhairi, C DeLeeuw, V Y Reddy, S J Weiss. Molecular Cloning of Human Cathepsin O, a Novel Endoproteinase and Homologue of Rabbit OC2. *FEBS Lett.* 1995 Jan 3;357(2):129-34.
164. B Wang , G P Shi, P M Yao, Z Li, H A Chapman, D Brömme. Human Cathepsin F. Molecular Cloning, Functional Expression, Tissue Localization, and Enzymatic Characterization. *J Biol Chem.* 1998 Nov 27;273(48):32000-8.
165. T Wex , B Levy, H Wex, D Brömme. Human Cathepsins F and W: A New Subgroup of Cathepsins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jun 7;259(2):401-7.
166. D K Nägler , R Ménard. Human Cathepsin X: A Novel Cysteine Protease of the Papain Family With a Very Short Proregion and Unique Insertions. *FEBS Lett .* 1998 Aug 28;434(1-2):135-9.
167. Yoshihiro Aiba , Kenichi Harada , Masahiro Ito , Takashi Suematsu , Shinichi Aishima , Yuki Hitomi , Nao Nishida , Minae Kawashima , Mitsuhsa Takatsuki , Susumu Eguchi , Shinji Shimoda , Hitomi Nakamura , Atsumasa Komori , Seigo Abiru , Shinya Nagaoka , Kiyoshi Migita , Hiroshi Yatsunami , Katsushi Tokunaga , Minoru Nakamura · Increased Expression and Altered Localization of Cathepsin Z Are Associated With Progression to Jaundice Stage in Primary Biliary Cholangitis. *Sci Rep.* 2018 Aug 7;8(1):11808.
168. Xin, X.Q., Gunesequera, B., and Mason, R.W. (1992). The specificity and elastinolytic activities of bovine cathepsins S and H. *Arch. Biochem. Biophys.* 299, 334–339.

169. Morton, P.A., Schwartz, B.D., Zacheis, L., Ciacoletto, K.S., and Manning, J.A. (1995). Nascent MHC class II-invariant chain complexes to lysosomal compartments and proteolysis. *J. Immunol.* 154, 137–150.
170. Chapman, H.A., Riese, R.J., and Shi, G.P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 63–88.
171. Jordans, S., Jenko-Kokalj, S., Kuhl, N.M., Tedelind, S., Sendt, W., Bromme, D. Turk, D., and Brix, K. (2009). Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L and S at physiological pH and redox conditions. *BMC Biochem.* 10, 23.
172. Chen, R-P., Ren, A., and Ye, S-D. (2013a). Correlation between serum cathepsin S and insulin resistance in type 2 . *Exp. Ther. Med.* 6, 1237–1242.
173. Richard D A Wilkinson, Rich Williams, Christopher J Scott, Roberta E Burden. Cathepsin S: Therapeutic, Diagnostic, and Prognostic Potential. *Biol Chem.* 2015 Aug;396(8):867-82.
174. Alan J. Barrett. Human cathepsin B1. Purification and some properties of the enzyme. *Biochem J.* 1973 Apr; 131(4): 809–822.
175. Takio K., Towatari,T., Katunuma,N., Teller,D.C. and Titani,K. (1983) Homology of amino acid sequences of liver cathepsins B and H with that of papain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 80, 3660–3670
176. Howie AJ, Burnett D, Crocker J. The distribution of cathepsin B in human tissues. *J Pathol* (1985) 145:307–14.
177. Kirschke H., Barrett,A.J. and Rawlings,N.D. (1995) Lysosomal cysteine proteases. In Sheterline,P. (ed.), *Protein Profile*. Vol. 2. Academic Press, London, UK, pp. 1587–1643.
178. O Quraishi , D K Nägler, T Fox, J Sivaraman, M Cygler, J S Mort, A C Storer. The Occluding Loop in Cathepsin B Defines the pH Dependence of Inhibition by Its Propeptide. *Biochemistry.* 1999 Apr 20;38(16):5017-23
179. Dalet-Fumeron V, Boudjennah L, Pagano M. Competition between plasminogen and procathepsin B as a probe to demonstrate the in vitro activation of procathepsin B by the tissue plasminogen activator. *Arch Biochem Biophys.* 1996;335:2

180. Maciewicz RA, Wotton SF, Etherington DJ, Duance VC. Susceptibility of the cartilage collagens types II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS Lett.* 1990;269:1.
181. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J.* 1992 Feb 15;282(Pt 1)
182. Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C, Hanahan D, Joyce JA. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* 2006;20:5.
183. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E, Juliano L, Nader HB, Tersariol IL. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem.* 2001;276:2.
184. C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A BiolSci Med Sci.* 2014 Jun;69Suppl 1:S4-9.
185. Li W, Dalen H, Eaton JW, Yuan XM. Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:7.
186. Zhao CF¹, Herrington DM². The function of cathepsins B, D, and X in atherosclerosis. *Am J Cardiovasc Dis.* 2016 Nov 30;6(4):163-170.
187. Wyczałkowska-Tomasik A, Pączek L. Cathepsin B and L activity in the serum during the human aging process: cathepsin B and L in aging. *Gerontol Geriatr* 2012 Nov-Dec;55(3):735-8.
188. Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Kauppinen A. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: impact on the aging process and age-related diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Sep;69(18):2999-3013.
189. Li W, Yuan XM. Increased expression and translocation of lysosomal cathepsins contribute to macrophage apoptosis in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1030
190. Li W, Dalen H, Eaton JW, Yuan XM. Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:7.

191. Lemaire R, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, Flipo RM. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 735-43.
192. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan; 1824(1):68-88
193. Smith ER, Tomlinson LA, Ford ML, McMahon LP, Rajkumar C, Holt SG. Elastin degradation is associated with progressive aortic stiffening and all-cause mortality in predialysis chronic kidney disease. *Hypertension*. 2012 May; 59(5):973-8.
194. Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension*. 1997 Apr; 29(4):999-1006.
195. Nakao S, Zandi S, Sun D, Hafezi-Moghadam A. Cathepsin B-mediated CD18 shedding regulates leukocyte recruitment from angiogenic vessels. *FASEB J*. 2018 Jan; 32(1): 143–154.
196. Liu A, Gao X, Zhang Q, Cui L. Cathepsin B inhibition attenuates cardiac dysfunction and remodeling following myocardial infarction by inhibiting the NLRP3 pathway. *Mol Med Rep*. 2013 Aug; 8(2):361-6.
197. Guo, Haitao, Justin B Callaway, and Jenny P-Y Ting. “Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics.” *Nature Medicine* 2015, 21 (7): 677–87.
198. Chen, Jiqiu, Ching Hsuan Tung, Umar Mahmood, Vasilis Ntziachristos, Robert Gyurko, Mark C. Fishman, Paul L. Huang, and Ralph Weissleder. “In Vivo Imaging of Proteolytic Activity in Atherosclerosis.” *Circulation*. 2002 Jun 11; 105(23):2766-71.
199. Abd-Elrahman I, Meir K, Kosuge H, Ben-Nun Y, Weiss Sadan T, Rubinstein C, Samet Y, McConnell MV, Blum G. Characterizing Cathepsin Activity and Macrophage Subtypes in Excised Human Carotid Plaques. *Stroke*. 2016 Apr; 47(4):1101-8.
200. Lohoefer F, Reeps C, Lipp C, Rudelius M, Zimmermann A, Ockert S, Eckstein HH, Pelisek J. Histopathological analysis of cellular localization of

- cathepsins in abdominal aortic aneurysm wall. *Int J Exp Pathol*. 2012 Aug;93(4):252-8.
201. Manu O, Platt and W. Andrew Shockey. Endothelial cells and cathepsins: biochemical and biomechanical regulation *Biochimie*. 2016 Mar; 122: 314–323.
202. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA and Libby P: Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1998; 102: 576- 583
203. Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, Kodama T, Tsimikas S, Witztum JL, Lu ML, Sakara Y, Chin MT, Libby P and Shi GP: Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor- deficient mice. *J Clin Invest*, 2003; 111: 897-906
204. Rodgers KJ, Watkins DJ, Miller AL, Chan PY, Karanam S, Brissette WH, Long CJ and Jackson CL: Destabilizing role of cathepsin S in murine atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26: 851-856
205. Cheng XW, Kuzuya M, Sasaki T, Arakawa K, Kanda S, Sumi D, Koike T, Maeda K, Tamaya-Mori N, Shi GP, Saito N and Iguchi A: Increased expression of elastolytic cysteine proteases, cathepsins S and K, in the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Am J Pathol*, 2004; 164: 243-251
206. Shi HT, Wang Y, Jia LX, Qin YW, Liu Y, Li HH, Qi YF and Du J: Cathepsin S contributes to macrophage migration via degradation of elastic fibre integrity to facilitate vein graft neointimal hyperplasia. *Cardiovasc Res*, 2014; 101: 454-463
207. Qin Y, Cao X, Guo J, Zhang Y, Pan L, Zhang H, Li H, Tang C, Du J and Shi GP: Deficiency of cathepsin S attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res*, 2012; 96: 401-410
208. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K and Hashimoto N: Cathepsin B, K, and S are expressed in cerebral aneurysms and promote the progression of cerebral aneurysms. *Stroke*, 2008; 39: 2603-2610
209. Van Vickle-Chavez SJ, Tung WS, Absi TS, Ennis TL, Mao D, Cobb JP and Thompson RW: Temporal changes in mouse aortic wall gene expression during the development of elastase-induced abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 2006; 43: 1010-1020

210. Wu H, Cheng XW, Hu L, Hao CN, Hayashi M, Take-shita K, Hamrah MS, Shi GP, Kuzuya M and Murohara T: Renin inhibition reduces atherosclerotic plaque neo- vessel formation and regresses advanced atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 2014; 237: 739-747
211. Liu J, Ma L, Yang J, Ren A, Sun Z, Yan G, Sun J, Fu H, Xu W, Hu C and Shi GP: Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis*, 2006; 186: 411-419
212. Gu FF, Lu SZ, Chen YD, Zhou YJ, Song XT, Jin ZN and Liu H: Relationship between plasma cathepsin S and cystatin C levels and coronary plaque morphology of mild to moderate lesions: an in vivo study using intra- vascular ultrasound. *Chinese Med J-Peking*, 2009; 122: 2820-2826
213. Marina Cecelja, Benyu Jiang, Lisa Bevan, Michelle L Frost, Tim D Spector, Phil J Chowienczyk. Arterial Stiffening Relates to Arterial Calcification but Not to Noncalcified Atheroma in Women. A Twin Study. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Mar 29;57(13):1480-6.
214. Elena Aikawa, Masanori Aikawa, Peter Libby, Jose-Luiz Figueiredo, Gabriel Rusanescu, Yoshiko Iwamoto, Daiju Fukuda, Rainer H Kohler, Guo-Ping Shi, Farouc A Jaffer, Ralph Weissleder. Arterial and Aortic Valve Calcification Abolished by Elastolytic Cathepsin S Deficiency in Chronic Renal Disease. *Circulation*. 2009 Apr 7;119(13):1785-94.
215. Edward R Smith, Laurie A Tomlinson, Martin L Ford, Lawrence P McMahon, Chakravarthi Rajkumar, Stephen G Holt. Elastin Degradation Is Associated With Progressive Aortic Stiffening and All-Cause Mortality in Predialysis Chronic Kidney Disease. *Hypertension*. 2012 May;59(5):973-8.
216. Tommy Weiss-Sadan, Israel Gotsman, Galia Blum. Cysteine proteases in atherosclerosis. *FEBS J* 2017
217. Wuopio J, Hilden J, Bring C, Kastrup J, Sajadieh A, Jensen GB, Kjølner E, Kolmos HJ, Larsson A, Jakobsen JC, Winkel P, Gluud C, Carlsson AC, Ärnlöv J. Cathepsin B and S as markers for cardiovascular risk and all-cause mortality in patients with stable coronary heart disease during 10 years: a CLARICOR trial sub-study. *Atherosclerosis*. 2018 Nov;278:97-102.

218. Kavita K. Shalia, Manoj R. Mashru, Vinod K. Shah, Surendra L. Soneji, Satchidanand Payannavar. Levels of cathepsins in acute myocardial infarction. *Indian Heart J.* 2012 May; 64(3): 290–294.
219. Elisabeth Jobs, Erik Ingelsson, Ulf Risérus, Elisabet Nerpin, Magnus Jobs, Johan Sundström, Samar Basu, Anders Larsson, Lars Lind, Johan Ärnlöv. Association Between Serum Cathepsin S and Mortality in Older Adults. *JAMA.* 2011 Sep 14;306(10):1113-21.
220. Lutgens, S.P., K.B. Cleutjens, M.J. Daemen, and S. Heeneman, Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *Faseb j*, 2007. 21(12): p. 3029-41.
221. Blondelle, J., S. Lange, B.H. Greenberg, and R.T. Cowling, Cathepsins in heart disease- chewing on the heartache? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. 308(9): p. H974-6.
222. Burns-Kurtis CL, Olzinski AR, Needle S, Fox JH, Capper EA, Kelly FM, McQueney MS, Romanic AM. Cathepsin S expression is up-regulated following balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *Cardiovasc Res.* 2004;62:610–620.
223. Liu J, Sukhova GK, Yang JT, Sun J, Ma L, Ren A, Xu WH, Fu H, Dolganov GM, Hu C, Libby P, Shi GP. Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells. *Atherosclerosis.* 2006;184:302–311.
224. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Di Q, Liu Z, Sasaki T, Kanda S, Jin H, Shi GP, Murohara T, Yokota M, Iguchi A. Localization of cysteine protease, cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with integrin $\alpha 3$. *Am J Pathol.* 2006;168:685–694.
225. Schulte S, Sun J, Libby P, Macfarlane L, Sun C, Lopez-Illasaca M, Shi GP, Sukhova GK. Cystatin C deficiency promotes inflammation in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in atherosclerotic mice. *Am J Pathol.* 2010;177:456–463.
226. Shi GP, Sukhova GK, Kuzuya M, Ye Q, Du J, Zhang Y, Pan JH, Lu ML, [162]

- Cheng XW, Iguchi A, Perrey S, Lee AM, Chapman HA, Libby P. Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res*. 2003;92:493–500.
227. Papaspyridonos M, Smith A, Burnand KG, Taylor P, Padayachee S, Suckling KE, et al. Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1837–44.
228. Xian Wu Cheng, Zhe Huang, Masafumi Kuzuya, Kenji Okumura, Toyoaki Murohara. Cysteine protease cathepsins in atherosclerosis-based vascular disease and its complications. *Hypertension*. 2011 Dec;58(6):978-86.
229. Irma Stern, Janja Marc, Igor Kranjec, Darko Zorman, Andreja Cerne, . Increased plasma levels of CATS mRNA but not CATB mRNA in patients with coronary atherosclerosis. *Clin Biochem*. 2010 Dec;43(18):1427-30.
230. Ling Yan, Shuang Ding, Bing Gu, Ping Ma. Clinical application of simultaneous detection of cystatin C, cathepsin S, and IL-1 in classification of coronary artery disease. *J Biomed Res*. 2017 Jul 13;31(4):315-320.
231. Isusi E, Aspichueta P, Liza M, Hernández ML, Díaz C, Hernández G, et al. Short- and long-term effects of atorvastatin, lovastatin and simvastatin on the cellular metabolism of cholesteryl esters and VLDL secretion in rat hepatocytes. *Atherosclerosis* 2000;153:283–94.
232. Chen J, Tung CH, Mahmood U, Ntziachristos V, Gyurko R, Fishman MC, Huang PL, Weissleder R. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Jun 11;105(23):2766-71.
233. Tsuchida K, Aihara H, Isogai K, Hanada K, Shibata N. Degradation of myocardial structural proteins in myocardial infarcted dogs is reduced by Ep459, a cysteine proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986;367:39 – 45.
234. Junbo Ge, Gang Zhao, Ruizhen Chen, Shuangjie Li, Shijun Wang, Xingang Zhang, Yamin Zhuang, Jiuzhong Du, Xiaohua Yu, Gaoping Li, Yingzhen Yang. Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2006 May;8(3):284-9.

235. Aiguo Liu, Xuan Gao, Qingbin Zhang, Lianqun Cui. Cathepsin B inhibition attenuates cardiac dysfunction and remodeling following myocardial infarction by inhibiting the NLRP3 pathway. *Mol Med Rep.* 2013 Aug;8(2):361-6.
236. Clinton S. Robbins, Ingo Hilgendorf, Georg F. Weber, Igor Theurl, Yoshiko Iwamoto, Jose-Luiz Figueiredo, Rostic Gorbатов, Galina K. Sukhova, Louisa M.S. Gerhardt, David Smyth, Caleb C. J. Zavitz, Eric A. Shikatani, Michael Parsons, Nico van Rooijen, Herbert Y. Lin, Mansoor Husain, Peter Libby, Matthias Nahrendorf, Ralph Weissleder, and Filip K. Swirski. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 2013
237. Clinton S. Robbins, Aleksey Chudnovskiy, MS Philipp J. Rauch, BS, Jose-Luiz Figueiredo, MD, Yoshiko Iwamoto, BS, Rostic Gorbатов, BS, Martin Etzrodt, BS, Georg F. Weber, MD, Takuya Ueno, MD, PhD,¹ Nico van Rooijen, Mary Jo Mulligan-Kehoe, PhD, Peter Libby, MD, Matthias Nahrendorf, Mikael J. Pittet, , Ralph Weissleder, MD, PhD,¹ and Filip K. Swirski. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6Chigh monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation* 125, 364–374 (2012).
238. Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, Pagler T, Bijl N, Kuo CL, Wang M, Sanson M, Abramowicz S, Welch C, Bochem AE, Kuivenhoven JA, Yvan-Charvet L, Tall AR. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytois, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4138–4149 (2011). 37.
239. Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbатов R, Robbins CS, Iwamoto Y, Thompson B, Carlson AL, Heidt T, Majmudar MD, Lasitschka F, Etzrodt M, Waterman P, Waring MT, Chicoine AT, van der Laan AM, Niessen HW, Piek JJ, Rubin BB, Butany J, Stone JR, Katus HA, Murphy SA, Morrow DA, Sabatine MS, Vinegoni C, Moskowitz MA, Pittet MJ, Libby P, Lin CP, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* 487,325–329 (2012).
240. Filip K Swirski, Mikael J Pittet, Moritz F Kircher, Elena Aikawa, Farouc A Jaffer, Peter Libby, Ralph Weissleder. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10340–10345 (2006).

241. Filip K Swirski, Peter Libby, Elena Aikawa, Pilar Alcaide, F William Luscinskas, Ralph Weissleder, Mikael J Pittet. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest.* 117, 195–205 (2007).
242. Frank Tacke, David Alvarez, Theodore J Kaplan, Claudia Jakubzick, Rainer Spanbroek, Jaime Llodra, Alexandre Garin, Jianhua Liu, Matthias Mack, Nico van Rooijen, Sergio A Lira, Andreas J Habenicht, Gwendalyn J Randolph. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 117, 185–194 (2007).
243. Stephane Potteaux, Emmanuel L Gautier, Susan B Hutchison, Nico van Rooijen, Daniel J Rader, Michael J Thomas, Mary G Sorci-Thomas, Gwendalyn J Randolph. Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of *ApoE*^{-/-} mice during disease regression. *J. Clin. Invest.* 121, 2025–2036 (2011).
244. Xiaoqian Lou, Xiaoyan Ma, Dawei Wang, Xiangjun Li, Bo Sun, Tong Zhang, Meng Qin, Liqun Ren. Systematic analysis of long non-coding RNA and mRNA expression changes in ApoE-deficient mice during atherosclerosis. *Mol Cell Biochem.* 2019
245. Ru-Qiang Liang, Wei Li, Yang Li, Cui-yan Tan, Jian-Xun Li, You-Xin Jin, Kang-Cheng Ruan. An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e17.
246. Robert S. Jansen, Hilde Rosing, Jan H. M. Schellens, and Jos H. Beijnen. Protein versus DNA as a marker for peripheral blood mononuclear cell counting. *Anal Bioanal Chem.* 2009
247. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, Ballantyne CM, Criqui MH, Elkind MS, Go AS, Harrell FE Jr, Hong Y, Howard BV, Howard VJ, Hsue PY, Kramer CM, McConnell JP, Normand SL, O'Donnell CJ, Smith SC Jr, Wilson PW; Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. American Heart Association Expert Panel on Subclinical Atherosclerotic Diseases and Emerging Risk Factors and the Stroke Council. *Circulation.* 2009 May 5;119(17):2408-16.

248. Kaoru Saegusa, Naozumi Ishimaru, Kumiko Yanagi, Rieko Arakaki, Kouichi Ogawa, Ichiro Saito, Nobuhiko Katunuma, Yoshio Hayashi. Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J Clin Invest.* 2002 Aug;110(3):361-9.
249. Patrick Hargreaves, Douglas Daoudlarian, Michel Theron, Fabrice A Kolb, Marianne Manchester Young, Bernhard Reis, Andre Tladen, Bettina Bannert, Diego Kyburz, Tobias Manigold. Differential effects of specific cathepsin S inhibition in biocompartments from patients with primary Sjögren syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2019 Jul 18;21(1):175.
250. Cong-Lin Liu, Junli Guo, Xian Zhang, Galina K Sukhova, Peter Libby, Guo-Ping Shi. Cysteine protease cathepsins in cardiovascular disease: from basic research to clinical trials. *Nat Rev Cardiol.* 2018 Jun;15(6):351-370.
251. Cohn JN, Quyyumi AA, Hollenberg NK, Jamerson KA. Surrogate markers for cardiovascular disease: functional markers. *Circulation.* 2004;109(25 suppl 1):IV31–IV46.
252. Nichols WW, O'Rourke MF, eds. Properties of the arterial wall. In: McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles. New York, NY: Oxford University Press; 2005: 80–82.
253. Raymond R Townsend, Ian B Wilkinson, Ernesto L Schiffrin, Alberto P Avolio, Julio A Chirinos, John R Cockcroft, Kevin S Heffernan, Edward G Lakatta, Carmel M McEniery, Gary F Mitchell, Samer S Najjar, Wilmer W Nichols, Elaine M Urbina, Thomas Weber, American Heart Association Council on Hypertension. Recommendations for Improving and Standardizing Vascular Research on Arterial Stiffness: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension.* 2015 Sep;66(3):698-722.
254. Mancini GB, Dahlof B, Díez J. Surrogate markers for cardiovascular disease: structural markers. *Circulation.* 2004;109(25 suppl 1):IV22–IV30.
255. Khoury Z, Schwartz R, Gottlieb S, Chenzbraun A, Stern S, Keren A. Relation of coronary artery disease to atherosclerotic disease in the aorta, carotid and femoral arteries evaluated by ultrasound. *Am J Cardiol.* 1997;80:1429 –1433.
256. I Wendelhag, T Gustavsson, M Suurkula, G Berglund, J Wikstrand. Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental

- principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol*. 1991 Nov;11(6):565-77.
257. Wendelhag I, Liang Q, Gustavsson T, Wikstrand J A new automated computerized analyzing system simplifies readings and reduces the variability in ultrasound measurement of intima-media thickness.. *Stroke*. 1997;28(11):2195-200.
258. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaut E, Woo KS, Zannad F, Zureik M. Manheim carotid intima-media thickness consensus (2004 –2006). *Cerebrovascular Dis*. 2007;23:75– 80.
259. Vijay Nambi , Lloyd Chambless, Aaron R Folsom, Max He, Yijuan Hu, Tom Mosley, Kelly Volcik, Eric Boerwinkle, Christie M Ballantyne. Carotid Intima-Media Thickness and Presence or Absence of Plaque Improves Prediction of Coronary Heart Disease Risk: The ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) Study. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Apr 13;55(15):1600-7.
260. Martín Laclaustra , José A Casanovas, Antonio Fernández-Ortiz , Valentin Fuster , Monserrat León-Latre , Luis J Jiménez-Borreguero , Miguel Pocovi , Yamilee Hurtado-Roca , José M Ordovas , Estibaliz Jarauta , Eliseo Guallar , Borja Ibañez , Fernando Civeira. Femoral and Carotid Subclinical Atherosclerosis Association With Risk Factors and Coronary Calcium: The AWHs Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Mar 22;67(11):1263-74.
261. Borja Ibanez, Stefan James, Stefan Agewall, Manuel J Antunes, Chiara Bucciarelli-Ducci, Héctor Bueno, Alida L P Caforio, Filippo Crea, John A Goudevenos, Sigrun Halvorsen, Gerhard Hindricks, Adnan Kastrati, Mattie J Lenzen, Eva Prescott, Marco Roffi, Marco Valgimigli, Christoph Varenhorst, Pascal Vranckx, Petr Widimský, ESC Scientific Document Group. 2017 ESC Guidelines for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting With ST-segment Elevation: The Task Force for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting With ST-segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018 Jan 7;39(2):119-177
262. Kimon Stamatelopoulos , Dirk Sibbing , Loukianos S Rallidis , Georgios Georgiopoulos , Dimitrios Stakos , Siegmund Braun , Aikaterini Gatsiou , Kateryna

- Sopova, Christos Kotakos, Christos Varounis, Constantinos C Tellis, Efstathios Kastritis, Maria Alevizaki, Alexandros D Tselepis, Panagiotis Alexopoulos, Christoph Laske, Till Keller, Adnan Kastrati, Stefanie Dimmeler, Andreas M Zeiher, Konstantinos Stellos. Amyloid-beta (1-40) and the risk of death from cardiovascular causes in patients with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar 10;65(9):904-16.
263. Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration» Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J*. 2010 Oct;31(19):2338-50.
264. Wyczałkowska-Tomasik A, Pączek L B and L activity in the serum during the human aging process: cathepsin B and L in aging. *Gerontol Geriatr* 2012 Nov-Dec;55(3):735-8.
265. AlGhatrif M, Strait JB, Morrell CH, Canepa M, Wright J, Elango P, Scuteri A, Najjar SS, Ferrucci L, Lakatta EG. Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Hypertension*. 2013 Nov;62(5):934-41.
266. Sasahara M, Hazama F, Amano S, Hayase Y, Yukioka N, Kawai J, Kataoka H. Effect of hypertension on lysosomal enzyme activities in aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 1988 Mar;70(1-2):53-62.
267. Pauca AL, O'Rourke MF, Kon ND. Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform. *Hypertension*. 2001 Oct;38(4):932-7.
268. Lacolley P, Regnault V, Avolio AP. Smooth muscle cell and arterial aging: basic and clinical aspects, *Cardiovasc Res*. 2018 Mar 15;114(4):513-528.
269. Stam F, van Guldener C, Schalkwijk CG, ter Wee PM, Donker AJ, Stehouwer CD. Impaired renal function is associated with markers of endothelial dysfunction and increased inflammatory activity. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 May;18(5):892-8.
270. Chen, Jiqui, Ching Hsuan Tung, Umar Mahmood, Vasilis Ntziachristos, Robert Gyurko, Mark C. Fishman, Paul L. Huang, and Ralph Weissleder. "In Vivo Imaging of Proteolytic Activity in Atherosclerosis." *Circulation*. 2002 Jun 11;105(23):2766-71.

271. Dinnes DL, White MY, Kockx M, Traini M, Hsieh V, Kim MJ, Hou L, Jessup W, Rye KA, Thaysen-Andersen M, Cordwell SJ, Kritharides L. Human macrophage cathepsin B-mediated C-terminal cleavage of apolipoprotein A-I at Ser228 severely impairs antiatherogenic capacity. *FASEB J*. 2016 Dec;30(12):4239-4255.
272. Sehl PD, Tai JT, Hillan KJ, Brown LA, Goddard A, Yang R, Jin H, Lowe DG. Application of cDNA microarrays in determining molecular phenotype in cardiac growth, development, and response to injury. *Circulation*. 2000 Apr 25;101(16):1990-9.
273. Ge J, Zhao G, Chen R, Li S, Wang S, Zhang X, Zhuang Y, Du J, Yu X, Li G, Yang Y. Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2006 May;8(3):284-9. Epub 2006 Feb 15.
274. Mehra S, Kumar M, Manchanda M, Singh R, Thakur B, Rani N, Arava S, Narang R, Arya DS, Chauhan SS. Clinical significance of cathepsin L and cathepsin B in dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 2017 Apr;428(1-2):139-147. Epub 2017 Jan 10.
275. Cheng XW, Shi GP, Kuzuya M, Sasaki T, Okumura K, Murohara T. Role for cysteine protease cathepsins in heart disease: focus on biology and mechanisms with clinical implication. *Circulation*. 2012 Mar 27;125(12):1551-62.
276. Wiebke Wendt, Hermann Lübbert, Christine C Stichel. Upregulation of cathepsin S in the aging and pathological nervous system of mice. *Brain Res*. 2008 Sep 26;1232:7-20.
277. Xian Wu Cheng, Koji Obata, Masafumi Kuzuya, Hideo Izawa, Kae Nakamura, Eri Asai, Tetsuro Nagasaka, Masako Saka, Takahiro Kimata, Akiko Noda, Kohzo Nagata, Hai Jin, Guo-Ping Shi, Akihisa Iguchi, Toyoaki Murohara, Mitsuhiro Yokota. Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure. *Hypertension*. 2006 Nov;48(5):979-87.
278. Fanny Huyard, Catherine Zyzdorczyk, Michele M Castro, Anik Cloutier, Mariane Bertagnolli, Hervé Sartelet, Nathalie Germain, Blandine Comte, Richard Schulz, Denis DeBlois, Anne Monique Nuyt. Remodeling of aorta extracellular matrix as a result of transient high oxygen exposure in newborn rats:

- implication for arterial rigidity and hypertension risk. *PLoS One*. 2014 Apr 17;9(4):e92287.
279. Edward R Smith, Laurie A Tomlinson, Martin L Ford, Lawrence P McMahon, Chakravarthi Rajkumar, Stephen G Holt. Elastin degradation is associated with progressive aortic stiffening and all-cause mortality in predialysis chronic kidney disease. *Hypertension*. 2012 May;59(5):973-8.
280. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351:1296–1305.
281. Ford ML, Tomlinson LA, Chapman TP, Rajkumar C, Holt SG. Aortic stiffness is independently associated with rate of renal function decline in chronic kidney disease stages 3 and 4. *Hypertension*. 2010;55:1110–1115.
282. Weber T, Ammer M, Gunduz D, Bruckenberg P, Eber B, Wallner M. Association of increased arterial wave reflections with decline in renal function in chronic kidney disease stages 3 and 4. *Am J Hypertens*. 2011;24:762–769.
283. Chen SC, Chang JM, Liu WC, Tsai YC, Tsai JC, Hsu PC, Lin TH, Lin MY, Su HM, Hwang SJ, Chen HC. Brachial-ankle pulse wave velocity and rate of renal function decline and mortality in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:724–732.
284. Pai A, Leaf EM, El-Abbadi M, Giachelli CM. Elastin degradation and vascular smooth muscle cell phenotype change precede cell loss and arterial medial calcification in a uremic mouse model of chronic kidney disease. *Am J Pathol*. 2011;178:764–773.
285. Kumata C, Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, Kondo F, Kinugasa E, Akizawa T. Involvement of matrix metalloproteinase-2 in the development of medial layer vascular calcification in uremic rats. *Ther Apher Dial*. 2011;15(suppl 1):18–22.
286. Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Kiattisunthorn K, Gattone VH, Moe SM. Activation of arterial matrix metalloproteinases leads to vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2011;34:211–219.

287. Bouvet C, Moreau S, Blanchette J, de Blois D, Moreau P. Sequential activation of matrix metalloproteinase 9 and transforming growth factor in arterial elastocalcinosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28: 856–862.
288. Saulnier JM, Hauck M, Fulop T Jr, Wallach JM. Human aortic elastin from normal individuals and atherosclerotic patients: lipid and cation contents; susceptibility to elastolysis. *Clin Chim Acta.* 1991;200: 129–136.
289. Elisabeth Jobs, Ulf Risérus, Erik Ingelsson, Johan Sundström, Magnus Jobs, Elisabet Nerpin, David Iggman, Samar Basu, Anders Larsson, Lars Lind, Johan Ärnlöv. Serum cathepsin S is associated with decreased insulin sensitivity and the development of type 2 diabetes in a community-based cohort of elderly men. *Diabetes Care.* 2013 Jan;36(1):163-5.
290. Li ZY, Wang P, Miao CY. Adipokines in inflammation, insulin resistance and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011;38:888–896
291. Shi GP, Munger JS, Meara JP, Rich DH, Chapman HA. Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem* 1992;267:7258–7262
292. ReddyVY,ZhangQY,WeissSJ.Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3849– 3853
293. Lafarge JC, Naour N, Clément K, Guerre- Millo M. Cathepsins and cystatin C in atherosclerosis and obesity. *Biochimie* 2010;92:1580–1586
294. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92: 347–355
295. LiuJ,SukhovaGK,SunJS,XuWH,LibbyP,ShiGP:Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1359– 1366, 2004
296. Elmariah SB, Reddy VB, Lerner EA: Cathepsin S signals via PAR2 and generates a novel tethered ligand receptor agonist. *PLoS One* 9: e99702, 2014
297. Santhosh Kumar Vr, Murthy N Darisipudi, Stefanie Steiger, Satish Kumar Devarapu, Maia Tato, Onkar P Kukarni, Shrikant R Mulay, Dana Thomasova, Bastian Popper, Jana Demleitner, Gabriele Zuchtriegel, Christoph [171]

- Reichel, Clemens D Cohen, Maja T Lindenmeyer, Helen Liapis, Solange Moll, Emma Reid, Alan W Stitt, Brigitte Schott, Sabine Gruner, Wolfgang Haap, Martin Ebeling, Guido Hartmann, Hans-Joachim Anders: Cathepsin S Cleavage of Protease-Activated Receptor-2 on Endothelial Cells Promotes Microvascular Diabetes Complications. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Jun;27(6):1635-49.
298. Taleb S, Canello R, Poitou C, Rouault C, Sellam P, Levy P, Bouillot JL, Coussieu C, Basdevant A, Guerre-Millo M, Lacasa D, Clement K. Weight loss reduces adipose tissue cathepsin S and its circulating levels in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1042–7.
299. Jobs E, Risérus U, Ingelsson E, Helmersson J, Nerpin E, Jobs M, Sundström J, Lind L, Larsson A, Basu S, Arnlöv J. Serum cathepsin S is associated with serum C-reactive protein and interleukin-6 independently of obesity in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4460–4.
300. Fissolo N, Kraus M, Reich M, Ayturan M, Overkleeft H, Driessen C, Weissert R 2008 Dual inhibition of proteasomal and lysosomal proteolysis ameliorates autoimmune central nervous system inflammation. *Eur J Immunol* 38:2401–2411
301. Williams AS, Eynott PR, Leung SY, Nath P, Jupp R, De Sanctis GT, Resnick R, Adcock IM, Chung KF 2009 Role of cathepsin S in ozone-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Pulm Pharmacol Ther* 22:27–32
302. Zheng T, Kang MJ, Crothers K, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Rabach LA, Chapman HA, Homer RJ, Aldous D, De Sanctis GT, Underwood S, Graupe M, Flavell RA, Schmidt JA, Elias JA 2005 Role of cathepsin S-dependent epithelial cell apoptosis in IFN- γ -induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema. *J Immunol* 174:8106 – 8115
303. Taleb S, Lacasa D, Bastard JP, Poitou C, Canello R, Pelloux V, Viguier N, Benis A, Zucker JD, Bouillot JL, Coussieu C, Basdevant A, Langin D, Clement K 2005 Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: relevance to atherogenesis. *FASEB J* 19:1540 –1542
304. Liuzzo JP, Petanceska SS, Moscatelli D, Devi LA 1999 Inflammatory mediators regulate cathepsin S in macrophages and microglia: a role in attenuating heparan sulfate interactions. *Mol Med* 5:320 –333
305. Kitamura H, Kamon H, Sawa S, Park SJ, Katunuma N, Ishihara K, Murakami

- M, Hirano T 2005 IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. *Immunity* 23:491–502
306. Fajardo I, Svensson L, Bucht A, Pejler G 2004 Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 170:477–484.
307. Ovchinnikova O, Robertson AK, Wågsaeter D, Folco EJ, Hyry M, Myllyharju J, Eriksson P, Libby P, Hansson GK 2009 T-cell activation leads to reduced collagen maturation in atherosclerotic plaques of Apo E(/□) mice. *Am J Pathol* 174:693–700
308. Ridker PM, Silvertown JD. Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis. *J Periodontol* 2008;79:1544–51.
309. Ridker PM. Inflammatory biomarkers and risks of myocardial infarction, stroke, diabetes, and total mortality: implications for longevity. *Nutr Rev* 2007;65:S253–9.
310. Albert MA, Ridker PM. The role of C-reactive protein in cardiovascular disease risk. *Curr Cardiol Rep* 1999;1:99–104.
311. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, Braunwald E. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005;352:20–8.
312. De Nooijer R, Bot I, von der Thüsen JH, Leeuwenburgh MA, Overkleeft HS, Kraaijeveld AO, et al. Leukocyte cathepsin S is a potent regulator of both cell and matrix turnover in advanced atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:188–94.
313. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Di Q, Liu Z, Sasaki T, et al. Localization of cysteine protease, cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with integrin α 5 β 3. *Am J Pathol* 2006;168:685–94.
314. Riese RJ, Shi GP, Villadangos J, Stetson D, Driessen C, Lennon-Dumenil AM, et al. Regulation of CD1 function and NK1.1(+) T cell selection and maturation by cathepsin S. *Immunity* 2001;15:909–19.

315. Lindstedt L, Lee M, Oörni K, Brömme D, Kovanen PT. Cathepsins F and S block HDL3-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1019–24.
316. Murray, K., de Lera, J.M., Astudillo, A., and McNicol, A.M. 1997. Organisation of basement membrane components in the human adult and fetal pituitary gland and in pituitary adenomas. *Virchows Arch.* 431:329–335.
317. Moulton, K.S. 2001. Plaque angiogenesis and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 3:225–233.
318. Ai-Wu Zhang, Xin-Sheng Han, Xiao-Tian Xu, Yan-Nan Fang, Hong-Bing Chen, Tao Jiang. Acute phase serum cathepsin S level and cathepsin S/cystatin C ratio are the associated factors with cerebral infarction and their diagnostic value for cerebral infarction. *Kaohsiung J Med Sci.* 2019 Feb;35(2):95-101.
319. Bosa Mirjanic-Azaric, Jelena Vekic, Aleksandra Zeljkovic, Zorana Jelic-Ivanovic, Mirjana Djeric, Tatjana Milivojac, Ursa Pecar Fonovic, Janja Marc, Janko Kos, Darko Cerne. Interrelated cathepsin S-lowering and LDL subclass profile improvements induced by atorvastatin in the plasma of stable angina patients *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(8):868-77.
320. RahelBefekadu, Kjeld Christiansen, Anders Larsson, Magnus Grenegård. Increased plasma cathepsin S and trombospondin-1 in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Cardiol J* 2019;26(4):385-393.
321. Han Chen, Jing Wang, Mei-Xiang Xiang, Yan Lin, Aina He, Chun-Na Jin, Jian Guan, Galina K Sukhova, Peter Libby, Jian-An Wang, Guo-Ping Shi. Cathepsin S-mediated fibroblast trans-differentiation contributes to left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2013 Oct 1;100(1):84-94.
322. Torbjörn Akerfeldt, Anders Larsson. Inflammatory response is associated with increased cathepsin B and decreased cathepsin S concentrations in the circulation. *Scand J Clin Lab Invest.* 2011 May;71(3):203-7.
323. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, et al.. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 2010;24:241–255.

324. Veronika Klaus, Fadwa Schmies, Christian Reeps, Matthias Trenner, Sarah Geisbüsch, Fabian Lohoefer, Hans-Henning Eckstein, Jaroslav Pelisek. Cathepsin S is associated with degradation of collagen I in abdominal aortic aneurysm. *Vasa* 2018 Jun;47(4):285-293.
325. Hua Y, Nair S. Proteases in cardiometabolic diseases: Patho- physiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(2):195–208.
326. Shaw LJ, Bugiardini R, Merz CN. Women and ischemic heartdisease:evolvingknowledge. *JAmCollCardiol* 2009;54:1561–75
327. Anderson RD, Pepine CJ. Gender differences in the treatment for acute myocardial infarction: bias or biology? *Circulation* 2007;115:823–6.
328. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*. 2003;4(9):117.
329. Change David M Mauger, B Joseph Cabral, Vladimir Presnyak, Stephen V Su, David W Reid, Brooke Goodman, Kristian Link, Nikhil Khatwani, John Reynders, Melissa J Moore, Iain J McFadyen. mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Nov 26;116(48):24075-24083.
330. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(3):1720–30.