**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**
**ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ**
**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Α. ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ**

**ΞΕΝΑΚΗ Γ. ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ**
ΙΑΤΡΟΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

# ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ (CMV) ΣΕ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΠΛΑΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
**2008**

# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

## ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ: **Ξενάκη**
ΟΝΟΜΑ: **Ευαγγελία**
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΕΡΑ: **Γεώργιος**
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ: **Μαριάνα- Μαρίνα**
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: **Ηράκλειο Κρήτης**
ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: **1967**
ΤΟΠΟΣ ΔΙΑΜΟΝΗΣ: **Ηράκλειο**
ΤΗΛΕΦΩΝΑ: **2810-311096/ 2810-392814**
E-MAIL: exenaki@freemail.gr

## ΣΠΟΥΔΕΣ & ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

ΣΠΟΥΔΕΣ:
1984: Απολυτήριο Λυκείου από το 2ο Λύκειο Ηρακλείου με βαθμό «Άριστα» (19 9/10).
1984-1992: Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών ( εισαγωγή κατόπιν Πανελληνίων Εξετάσεων).
1992: Πτυχίο Ιατρικής από το Πανεπιστήμιο Αθηνών, με βαθμό «Λίαν Καλώς».
1999: Τίτλος ειδικότητας της Ιατρικής Βιοπαθολογίας.
2001-2008: Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ
Αγγλική: δίπλωμα Higher PALSO, grade: good.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΕΣ
Παρακολούθηση σεμιναρίου «Επιδημιολογικό πρόγραμμα Epi- Info» από 13.11.1997 έως 13.12.1997.
Γνώση χειρισμού ηλεκτρονικού υπολογιστή.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ
1992-1994: Υπηρεσία Υπαίθρου
1994: Ειδικότητα Παθολογίας
1994-1998: Ειδικότητα Βιοπαθολογίας
1999-2000: Εργασία σε ελεύθερο επάγγελμα.
2000 έως σήμερα: Επιμελήτρια Β΄ Βιοπαθολογίας (Μικροβιολογίας) στο Εργαστήριο Ιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ( Ξενόγλωσσες)

1. **Evangelia Xenaki**, John Hassoulass, Stavros Apostolakis, George Sourvinos and Demetrios A. Spandidos: Detection of Cytomegalovirus in atherosclerotic plaques and non atherosclerotic arteries. Angiology, In press.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. Ι. Δροσίτης, Χ. Λιονής, Ι. Μοσχανδρέα, Γ. Σουρβίνος, Μ. Παπαδακάκη, Ε. Παναγιωτάκη, Μ. Εργαζάκη, **Ε. Ξενάκη**, Α. Δερμιτζάκη, Δ.Α Σπαντίδος, Η. Κουρούμαλης. Ανακοίνωση στην ημερίδα για τα αποτελέσματα του έργου Πυθαγόρας ΙΙ στο Πανεπιστήμιο Κρήτης: «Επιδημιολογική και μοριακή μελέτη των ιών ηπατίτιδας σε συγκεκριμένη αγροτική περιοχή της Κρήτης: Πρώτα αποτελέσματα». (2008)

2. **Ε. Ξενάκη**, Ι. Χάσουλας, Γ. Σουρβίνος, Θ. Ξενικάκης, Δ.Α Σπαντίδος: «Ανίχνευση του ιού CMV σε αθηρωματικές πλάκες και φυσιολογικές αρτηρίες».
Poster στο 3ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας- 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής 2007.

3. Μ. Κουλεντάκη, Ε. Κουτσουνάκη, Γ. Τσιολακίδου, Ε. Ματρέλλα, **Ε. Ξενάκη**, Α. Δερμιτζάκη, Η. Κουρούμαλης: «Τρία χρόνια εμπειρίας με πεγκυλιωμένες ιντερφερόνες»
Poster- δημοσίευση στο Annals of Gastroenterology 2006.

4. Ε. Λυδάκη, Ε. Μπολωνάκη, **Ε. Ξενάκη**, Ε. Νικολούδη: «Ανίχνευση μεγαλοκυτταροϊού (CMV) στα παράγωγα αίματος»
Ανακοίνωση στο 14ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2003.

5. **Ε. Ξενάκη** ($7_o$ όνομα): «Συχνότητα εντεροπαθογόνων μικροβίων στις καλλιέργειες κοπράνων την περίοδο 1.3.1993 έως 31.12.1995 και αντοχή των σαλμονελλών στα συνήθη αντιβιοτικά»
Ανακοίνωση στο 8ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1996.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αρκετές μελέτες αναφέρουν μια συσχέτιση ανάμεσα σε λοιμογόνους παράγοντες και την αρτηριοσκλήρυνση. Ο Κυτταρομεγαλοϊός (CMV) είναι το πιο συχνά εμπλεκόμενο παθογόνο. Εντούτοις, ο ρόλος του Κυταρομεγαλοϊού στην αρτηριοσκλήρυνση παραμένει σκοτεινός. Στην παρούσα μελέτη, εμείς εκτιμήσαμε την παρουσία του DNA του Κυτταρομεγαλοϊού σε αθηρωματικές πλάκες και φυσιολογικά αγγειακά τοιχώματα. Λάβαμε 40 αρτηριακά δείγματα από αθηρωματικές πλάκες των στεφανιαίων αρτηριών και 27 δείγματα από φυσιολογικά αγγεία, από 26 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Τα δείγματα αναλύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την παρουσία της γονιδιακής περιοχής immediate early antigen του Κυτταρομεγαλοϊού. Το DNA του ιού ανιχνεύθηκε σε 9 από 26 ασθενείς (34,6%). Το ιϊκό DNA ανιχνεύθηκε και στους μη αρτηριοσκληρυντικούς ιστούς και στις αρηριοσκληρυντικές πλάκες. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Παρόμοια έλλειψη στατιστικής συσχέτισης παρατηρήθηκε ανάμεσα στην παρουσία του Κυτταρομεγαλοϊού και κλινικές παραμέτρους όπως αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, κάπνισμα και υπερλιπιδαιμία. Τα ευρήματά μας, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, δεν υποστηρίζουν άμεσο αιτιολογικό ρόλο του Κυτταρομεγαλοϊού στην ανάπτυξη αρτηριοσκληρυντικών πλακών.

**ABSTRACT**

Several studies have reported an association between infectious agents and atherosclerosis. Cytomegalovirus (CMV) is the most commonly implicated viral pathogen. However, the role of cytomegalovirus in atherosclerosis remains obscure. In the present study, we evaluated the presence of cytomegalovirus DNA in atherosclerotic plaques and normal vessel walls. Forty arterial specimens from coronary plaques and 27 samples from normal vessels were obtained from 26 patients who underwent aortocoronary bypass surgery. The specimens were analyzed by polymerase chain reaction for the presence of the cytomegalovirus immediate early genomic region. Cytomegalovirus DNA was detected in 9 out of 26 patients (34.6%). Viral DNA was detected in both non-atherosclerotic tissues and atherosclerotic plaques. No statistically significant differences were observed between normal and diseased vessels. A similar lack of statistical association was observed between the presence of CMV and clinical parameters such as arterial hypertension, diabetes mellitus, smoking or hypercholesterolemia. Our findings, in accordance with previous studies, do not support a direct causative role of CMV in the development of atherosclerotic plaques.

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τελειώνοντας τη διδακτορική διατριβή μου θεωρώ υποχρέωσή μου να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις θερμές μου ευχαριστίες, καταρχήν στον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Δημήτριο Σπαντίδο για την ευκαιρία που μου προσέφερε αναθέτοντάς μου αυτή τη διατριβή, το συνεχές ενδιαφέρον του για την πρόοδο της διατριβής μου, τις επιστημονικές γνώσεις, τις συμβουλές του και την αμέριστη συμπαράστασή του. Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Χάσουλα για την παροχή των δειγμάτων και των κλινικών δεδομένων, για την προθυμία με την οποία μου παρείχε τις γνώσεις του και για το συνεχές ενδιαφέρον του για την πρόοδο της διατριβής. Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Σουρβίνο για την συνεχή καθοδήγησή του, την προσφορά επιστημονικών γνώσεων, την διαρκή και ακούραστη υποστήριξή του και την βοήθειά του. Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο για τη βοήθειά του στο πρώτο μου ξεκίνημα και την παροχή πολλών επιστημονικών γνώσεων.

Επίσης, τα μέλη της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής Καθηγητή κ. Παναγιώτη Βάρδα και Καθηγητή κ. Γεώργιο Σαμώνη κι όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην διαδικασία αξιολόγησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία τους, τους διδάκτορες κ. Σταύρο Αποστολάκη, Γεώργιο Φλουρή, Δημήτριο Πανουτσόπουλο, Ιωάννα Διαλυνά, Ιωάννα Σούφλα, Δημήτριο Αρβανίτη και όλους ανεξαιρέτως τους συνεργάτες μου στο Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας, καθώς και κάθε άνθρωπο που συνέβαλε από την πλευρά του στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Χρωστώ ευγνωμοσύνη στους γονείς μου, που μου προσέφεραν την βοήθεια και την αμέριστη συμπαράστασή τους, καθ’όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ


| | ΣΕΛΙΔΑ |
|---|---|
| ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ | 2 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 4 |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 6 |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ | 7 |
| **Α΄ ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ** | |
| **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.** | |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | |
| 1.1 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΑΡΤΗΡΙΩΝ | 9 |
| 1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ | |
| 1.2.1 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ | 10 |
| 1.2.2 ΛΕΙΑ ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ | 15 |
| 1.2.3 ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ | 20 |
| 1.2.4 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ | 23 |
| 1.2.5 Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ | 24 |
| **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.** | |
| ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ | |
| 2.1 ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ, ΜΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΠΟΨΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ | 26 |
| 2.2 ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΒΛΑΒΗΣ | 28 |
| 2.3 ΦΛΕΓΜΟΝΗ | 30 |
| 2.4 ΑΦΡΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ | 32 |
| 2.5 ΑΠΩΤΕΡΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ | 33 |
| **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.** | |
| ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ | 36 |
| **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.** | |
| ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ CMV | 40 |
| 4.1 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ IN VITRO ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΟ ΡΟΛΟ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ | 41 |
| **ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ** | 42 |

**Β΄ ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.**

ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΙΣΤΩΝ 44

5.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ DNA 44

5.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ 44

5.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ CMV 47

5.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ 48

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.**

ΑΣΘΕΝΕΙΣ- ΥΛΙΚΑ

6.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ 49

6.2 ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΥΛΙΚΩΝ 50

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.**

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 51

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.**

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 55

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.**

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 61

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** 62

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ** 74

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η καρδιαγγειακή νόσος είναι μια από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας στις Δυτικές κοινωνίες. Η υποκείμενη διαταραχή είναι συνήθως η αρτηριοσκλήρυνση.

Η αρτηριοσκλήρυνση είναι μια χρονίως εξελισσόμενη νόσος των μεσαίου και μεγάλου μεγέθους αρτηριών που χαρακτηρίζεται από εναπόθεση λιπιδίων και παρουσία στον έσω χιτώνα, φλεγμονωδών κυττάρων όπως λεμφοκυττάρων, και μακροφάγων, τα οποία είναι πλούσια σε λιπίδια (αφρώδη κύτταρα), καθώς και συσσώρευση λείων μυϊκών κυττάρων και μεσοκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

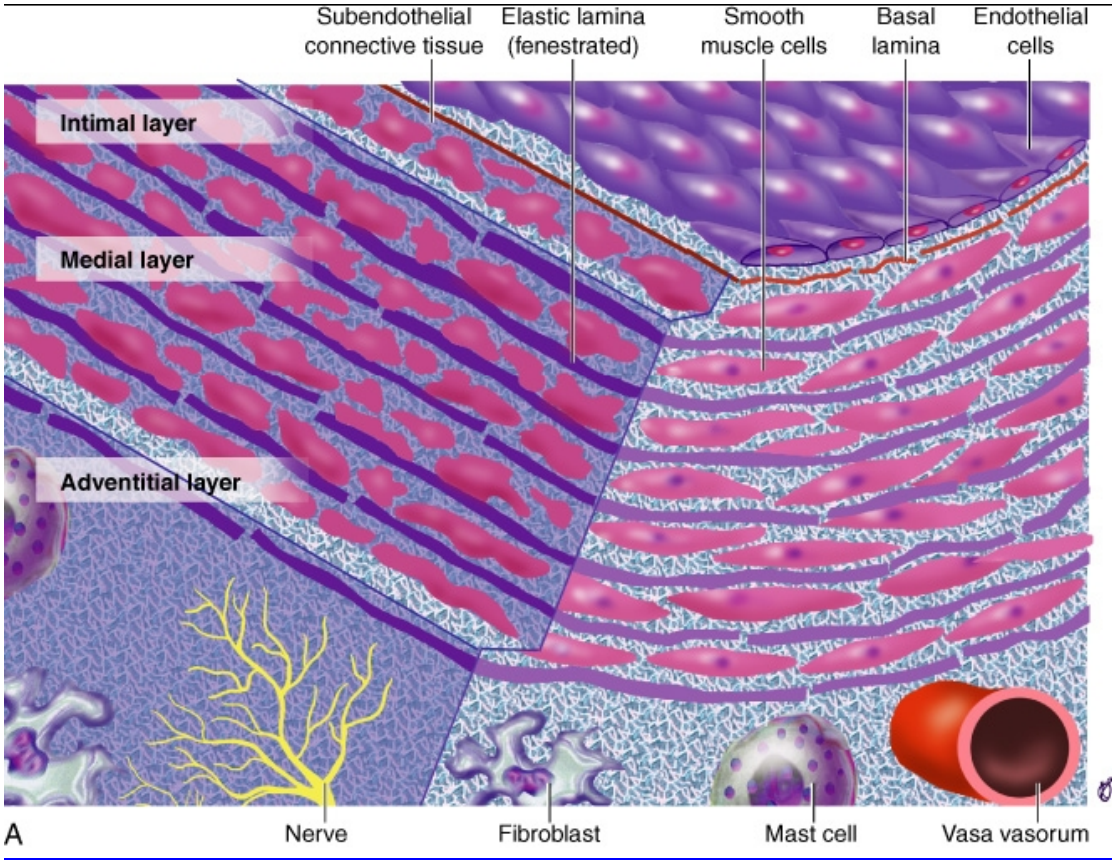
### 1.1 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΑΡΤΗΡΙΩΝ

Η φυσιολογική αρτηρία αποτελείται από έσω χιτώνα (intima), ο οποίος επικαλύπτεται από ενδοθήλιο στην έσω (προς τον αυλό) επιφάνεια ενώ προς τα έξω αφορίζεται από το έσω ελαστικό πέταλο. Ο μέσος χιτώνας (media) προς τα έσω αφορίζεται από το έσω ελαστικό πέταλο και προς τα έξω, στις καλά ανεπτυγμένες μυϊκές και ελαστικές αρτηρίες, από το έξω ελαστικό πέταλο. Ο έξω χιτώνας (adventitia) αφορίζεται εσωτερικά από το έξω ελαστικό πέταλο.

Ο έσω χιτώνας συνίσταται από ενδοθήλιο, βασική μεμβράνη και σχετικά λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού ο οποίος περιέχει αραιά λεία μυϊκά κύτταρα.

Ο μέσος χιτώνας είναι το μυϊκό τοίχωμα της αρτηρίας κι εκτός από σπειροειδή στρώματα λείων μυϊκών κυττάρων περιέχει και διάσπαρτα κολλαγόνα ινίδια και πρωτεογλυκάνες. Οι ελαστικές αρτηρίες περιέχουν πολλαπλά στρώματα ή πετάλια λείων μυϊκών κυττάρων περιβαλλόμενα από ελαστικές μεμβράνες. Έχει υποστηριχθεί ότι οι 29 πεταλιακές μονάδες είναι το μέγιστο πάχος του αρτηριακού τοιχώματος που μπορεί να μεταφέρει οξυγονωμένους μεταβολίτες από τον αυλό της αορτής μέχρι το εξώτερο πέταλο. Όταν υπάρχουν περισσότερες των 29 πεταλιακές μονάδες φαίνεται ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη τροφοφόρων αγγείων (vasa vasorum), τα οποία προέρχονται από τον έξω χιτώνα. Τα αγγεία αυτά τροφοδοτούν τις υπόλοιπες προς τα έξω πεταλιακές μονάδες (1,2).

Ο έξω χιτώνας έχει πυκνή υφή και αποτελείται από πολλές δέσμες κολλαγόνου και ελαστικών ινών και πολλούς ινοβλάστες με λίγα λεία μυϊκά κύτταρα. Είναι πλούσιος σε αγγεία (vasa vasorum) και νεύρα.




Copyright © 2005 by Elsevier Inc.

**Εικόνα 1:** Δομή φυσιολογικής αρτηρίας ελαστικού τύπου. Intimal layer: έσω χιτώνας, medial layer: μέσος χιτώνας, adventitial layer: έξω χιτώνας, elastic lamina (fenestrated): ελαστικό πέταλο (θυριδωτό), basal lamina: βασική μεμβράνη, subendothelial connective tissue: υποενδοθηλιακός συνδετικός ιστός, mast cell: μαστοκύτταρο, vasa vasorum: αγγεία αγγείων, fibroblast: ινοβλάστης.

## 1.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ

### 1.2.1 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα πιθανώς αποτελούν το μεγαλύτερο και πιο εκτεταμένο ιστό του σώματος, επειδή επαλείφουν εσωτερικά ολόκληρο το αγγειακό δένδρο. Στο αρτηριακό σύστημα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν συνεχή, λεία, μη διακοπτόμενη επιφάνεια και αποτελούν τον κύριο φραγμό μεταξύ στοιχείων του αίματος και του αρτηριακού τοιχώματος. Το ενδοθήλιο αποτελεί ένα φραγμό με πολύ

εκλεκτική διαπερατότητα (3,4), πιστεύεται ότι αποτελεί μη θρομβογόνο επιφάνεια (5), και είναι έντονα ενεργός μεταβολικά ιστός (6), που συνθέτει αγγειοενεργές ουσίες και μακρομόρια συνδετικού ιστού (7). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που εξετάζονται σε καλλιέργειες παρουσιάζουν επίσης προπηκτικές (procoagulant) ιδιότητες (8), ωστόσο είναι πιθανό ότι οι προπηκτικές αυτές ιδιότητες εκδηλώνονται σε περιπτώσεις βλάβης του ενδοθηλίου και πιθανώς δεν υπάρχουν in situ στη φυσιολογική αρτηρία (Εικ. 2. και 3.).

Αν και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς βλέπονται en face στο κοινό μικροσκόπιο και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (scanning electron microscopy) και σε εγκάρσιες τομές με το κοινό μικροσκόπιο και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης (transmission electron microscopy), φαίνεται ότι αν και μορφολογικά είναι απόλυτα όμοια στα διάφορα τμήματα του αρτηριακού δέντρου, ενδέχεται να έχουν λειτουργικές διαφορές στις διάφορες ανατομικές θέσεις. Για παράδειγμα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών έχουν επί της επιφάνειάς τους υποδοχείς για ένα ισχυρό ρυθμιστικό της αυξήσεως πεπτίδιο, τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα (platelet-derived growth factor, PDGF), ενώ τέτοιοι υποδοχείς δεν υπάρχουν στο ενδοθήλιο των αρτηριών (9). Πιθανώς, υπάρχουν και άλλες διαφορές, όχι μόνο μεταξύ ενδοθηλίου τριχοειδών και αρτηριών, αλλά και μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων σε διάφορα τμήματα του ίδιου του αρτηριακού δένδρου.

Με τις διαφορές αυτές θα περιμένει κανείς ότι υπάρχει διαφορετικός τρόπος απαντήσεως των ενδοθηλιακών κυττάρων σε βλάβες από έκθεση σε διάφορους βλαπτικούς παράγοντες στα διάφορα μέρη του αρτηριακού τοιχώματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα φυσιολογικά συνδέονται μεταξύ τους με σφικτές (tight junctions) και χασματικές συνδέσεις (gap junctions). Μεταφέρουν ουσίες και προς τις δύο κατευθύνσεις με τη διαδικασία της ενδοκυττώσεως που ενίοτε καλείται διακύττωση (transcytosis). Έχουν παρατηρηθεί διενδοθηλιακοί πόροι (transendothelial channels) στο ενδοθήλιο των τριχοειδών, ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν οι πόροι αυτοί παίζουν ρόλο στη μεταφορά μακρομορίων από το αίμα στους αρτηριακούς ιστούς. Έχει επίσης υποστηριχθεί ότι οι συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελούν δυνητικές θέσεις αυξήσεως της μεταφορικής ικανότητας του ενδοθηλίου, ιδίως όταν υπάρχει βλάβη αυτού.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα κείτονται επί μιας βασικής μεμβράνης, η οποία αποτελείται από μια ιδιαίτερη μορφή κολλαγόνου (κολλαγόνο τύπου IV) αναμειγμένου με ιδιαίτερους τύπους μορίων πρωτεογλυκάνης. Τα ενδοθηλιακά

κύτταρα αναμφίβολα ευθύνονται για τη σύνθεση των μορίων αυτών του συνδετικού ιστού (10). Η βασική μεμβράνη πιθανώς χρησιμεύει και ως ένα είδος αδρού ηθμού.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν επί της επιφανείας τους υποδοχείς για πολλά και διάφορα μόρια, όπως για τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) (11), για αυξητικούς παράγοντες και πιθανώς για μια σειρά φαρμακευτικούς παράγοντες. Μια ειδική ικανότητα του ενδοθηλίου ίσως είναι ιδιαίτερα σημαντική στην αθηρογένεση. Πρόκειται για την ικανότητα να τροποποιεί τις λιποπρωτεΐνες. Οι LDL φαίνεται ότι «τροποποιούνται» από μια διεργασία οξειδώσεως χαμηλού βαθμού (low-level oxidation), όταν συνδέονται με τους υποδοχείς LDL - τους (LDLR)- εσωτερικοποιούνται (internalized) και μεταφέρονται διαμέσου του ενδοθηλίου.

Οι τροποποιημένες αυτές LDL συνδέονται με ειδικό τύπο υποδοχέα, που έχει αποκληθεί υποδοχέας-καθαριστής (scavenger receptor), επί της επιφανείας των μακροφάγων, από τα οποία προσλαμβάνονται και συμβάλλουν στο σχηματισμό των αφροκυττάρων (foam cells). Η δραστηριότητα αυτή πιθανώς είναι σημαντική στην αθηρογένεση. Το ενδοθήλιο φυσιολογικά αποτελεί μια μη θρομβογόνο επιφάνεια, λόγω της ικανότητάς του να σχηματίζει προσταγλανδινικά παράγωγα, ιδίως προστακυκλίνη ($PGI_2$) έναν ισχυρό αγγειοδιαστολέα που αναστέλλει αποτελεσματικά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, και λόγω της επαλείψεώς του με στρώμα θειϊκής ηπαράνης (heparan sulfate).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν επίσης τον ισχυρότερο μέχρι σήμερα ανακαλυφθέντα αγγειοδιαστολέα, τον ενδοθηλιακό χαλαρωτικό παράγοντα (endothelial derived relaxing factor, EDRF), μια θειολική μορφή του νιτρικού οξειδίου ή υποξειδίου του αζώτου (NO). Η παραγωγή EDRF από το ενδοθήλιο είναι κρίσιμης σημασίας για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ αγγειοσυσπάσεως και αγγειοδιαστολής στη διαδικασία της αρτηριακής ομοιοστάσεως (12). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν επίσης παράγοντες που διαλύουν τους θρόμβους ινώδους, όπως πλασμινογόνο, καθώς και ουσίες που προάγουν την πήξη (procoagulant materials), όπως ο παράγοντας von Villebrand (8). Επίσης εκκρίνουν μια σειρά αγγειοενεργών παραγόντων, όπως ενδοθηλίνη (12), μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης και τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα, που ενδέχεται να έχουν μεγάλη σημασία για την αγγειοσύσπαση.

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ενδοθηλίου, πιθανώς μεγάλης σημασίας, είναι το γεγονός ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύσσονται υποχρεωτικά σε μονόστοιβο ιστό (obligate monolayer). Τέτοια ανάπτυξη είναι αντιπροσωπευτική κυττάρων που

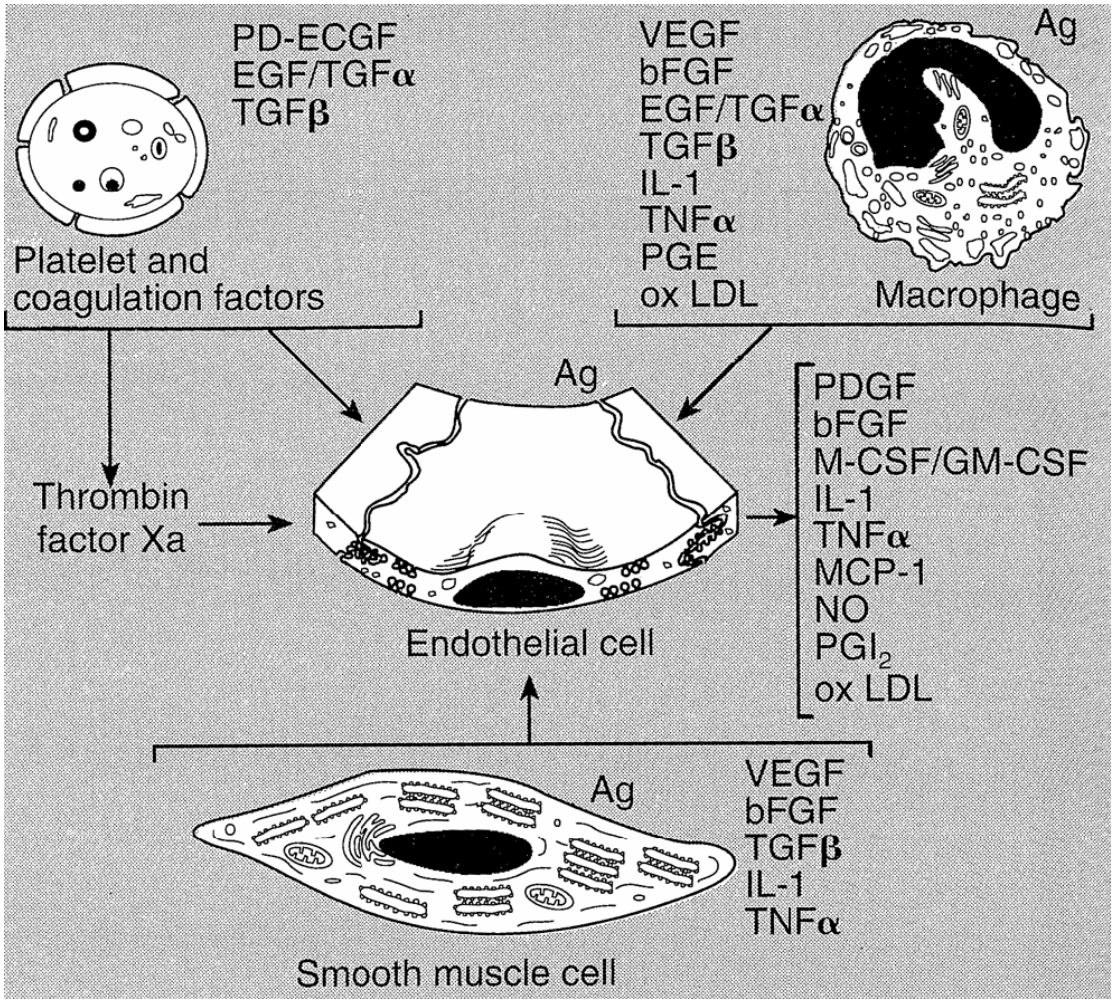
επαλείφουν τις περισσότερες επιφάνειες του σώματος, συμπεριλαμβανομένων και των επιθηλιακών επιφανειών, και χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα δε στοιβάζονται το ένα επάνω στο άλλο σε θέσεις βλάβης, προς διευκόλυνση της αποκαταστάσεως της επιφάνειας που απενδοθηλιώθηκε. Με άλλα λόγια, μόνο κύτταρα στα όρια της βλάβης συμμετέχουν στην αναγεννητική απάντηση. Έτσι, αν μια συγκεκριμένη ανατομική θέση βλάπτεται κατ' επανάληψη επί μακρό χρονικό διάστημα και αν τα πέριξ ενδοθηλιακά κύτταρα χάσουν την αναγεννητική τους ικανότητα, τα κύτταρα μακριά από το σημείο της βλάβης, που διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού, δεν μπορούν να μετάσχουν, επειδή δεν μπορούν να φθάσουν στο σημείο της βλάβης.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών συνθέτουν και εκκρίνουν διάφορα μιτογόνα, ένα από τα οποία είναι μια μορφή PDGF (13-15). Ο PDGF είναι αυξητικός παράγοντας για μεσεγχυματικής προελεύσεως κύτταρα που παράγουν συνδετικό ιστό, όπως οι ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα, όχι όμως και για τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών. Η ικανότητα του ενδοθηλίου όταν ενεργοποιηθεί κατάλληλα ώστε να σχηματίσει τέτοιους αυξητικούς παράγοντες, είναι σημαντική για την αθηρογένεση.

Επομένως, το ενδοθήλιο σχηματίζει ένα υποχρεωτικά μονόστοιβο που επαλείφει ολόκληρο το αρτηριακό δένδρο, είναι μεταβολικά ενεργό, παράγει αγγειοενεργές ουσίες, διαθέτει μη θρομβογόνο επιφάνεια και παράγει ουσίες που προάγουν την πήξη (16,17). Επίσης, ενεργεί ως ένας διαπερατός φραγμός που ελέγχει τη δίοδο μορίων προς το αρτηριακό τοίχωμα. Οξειδώνει τις LDL και παράγει νιτρικό οξείδιο (NO), τον κύριο παράγοντα με τον οποίο διατηρείται η αγγειοδιαστολή (18). Όλα αυτά αποδεικνύουν τη δυναμική φύση του ενδοθηλίου και τη μεγάλη σημασία του κυτταρικού αυτού στρώματος στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστάσεως. Όταν το ενδοθήλιο σχηματίζει οξειδωμένες LDL (oxLDL), βλάπτονται το ίδιο το ενδοθήλιο και υποκείμενα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος.

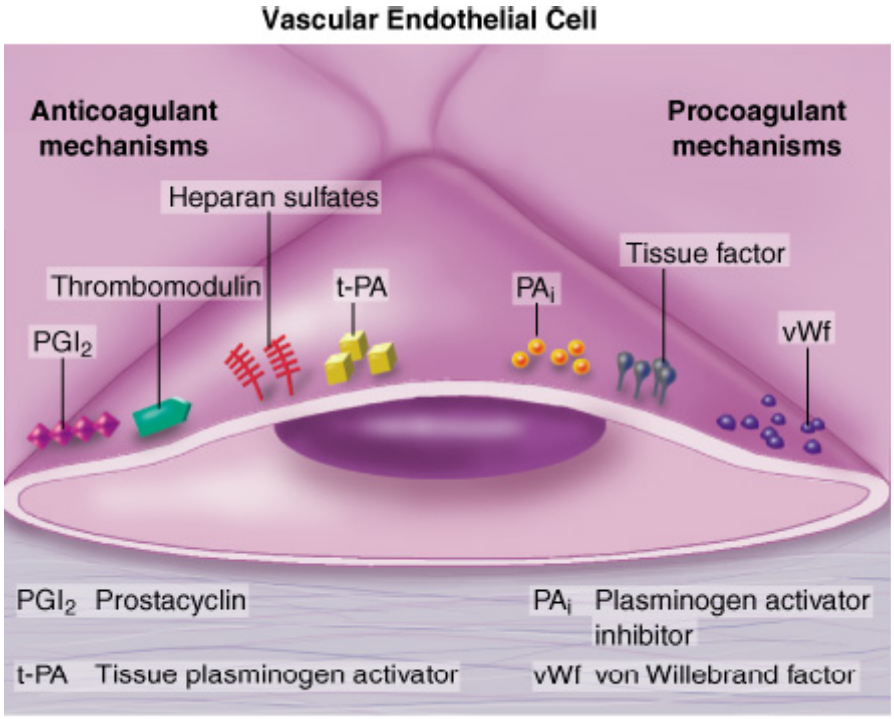
Οι οξειδωμένες LDL παίζουν σημαντικό πυροδοτικό ρόλο στην αύξηση της προσκολλήσεως και μεταναστεύσεως μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων-Τ από το αίμα στο αρτηριακό τοίχωμα. Οι oxLDL επάγουν το σχηματισμό τουλάχιστον δύο προσφυτικών μορίων (adhesive molecules) επί της επιφανείας του ενδοθηλίου: το μόριο προσφύσεως των αγγειακών κυττάρων-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) και το διακυττάριο μόριο προσφύσεως-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1). Τα δύο αυτά μόρια μετέχουν στην αύξηση της προσφύσεως

μονοκυττάρων και Τ-λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο μέσω αλληλεπιδράσεων τύπου ομοιοπολικού δεσμού (ligand type) των υποδοχέων με κατάλληλα μόρια επί της επιφάνειας των λευκοκυττάρων.




**Εικόνα 2:** Τα ενδοθηλιακά κύτταρα φυσιολογικά αποτελούν φραγμό προς το αρτηριακό τοίχωμα, έχουν αντιθρομβωτικές ιδιότητες και μεταβολίζουν πολυάριθμες αγγειοενεργές ουσίες, όπως προστακυκλίνη (PGI2) και νιτρικό οξείδιο (NO). Παράγουν αυξητικούς παράγοντες και θεμέλια ουσία συνδετικού ιστού. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλληλεπιδρούν επίσης με αιμοπετάλια, μονοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα. Τα κύρια προϊόντα των αιμοπεταλίων, των μακροφάγων και των λείων μυϊκών κυττάρων, τα οποία επηρεάζουν το ενδοθήλιο, δείχνονται στην εικόνα αυτή. Τα ενδοθηλιακά μιτογόνα, τα οποία παράγονται από τα μακροφάγα είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF), και ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας α (TGFα). Ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (TGFβ) καθώς και η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ο παράγοντας νεκρώσεως όγκου α (TNFα) αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και μπορεί να προκαλέσουν δευτερογενή έκφραση των γονιδίων άλλων αυξητικών-ρυθμιστικών μορίων από το ενδοθήλιο. Ο TGFβ είναι ισχυρός επαγωγέας συνθέσεως θεμέλιας ουσίας συνδετικού ιστού. Οι οξειδωμένες LDL (oxLDL), που παράγονται από το ενδοθήλιο, τα μακροφάγα ή τα λεία μυϊκά κύτταρα, μπορούν να βλάψουν σοβαρά τα γειτονικά ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα. Τα αιμοπετάλια μπορούν να δώσουν σωρεία αγγειοενεργών ουσιών, παραγόντων πήξεως και μιτογόνων. Η θρομβίνη και ο παράγοντας Χα από το πλάσμα μπορούν να διεγείρουν και να φέρουν το ενδοθήλιο σε προπηκτική κατάσταση (procoagulant state). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν επίσης μια σειρά αυξητικών-

ρυθμιστικών μορίων, όπως σημειώνεται στα δεξιά του ενδοθηλιακού κυττάρου της εικόνας, τα οποία προκαλούν πολλαπλασιασμό των γειτονικών κυττάρων και σχηματισμό από αυτά συνδετικού ιστού. Επειδή οι oxLDL ίσως είναι η κύρια αιτία της αθηρογενέσεως, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι η πρώτη δυνητική θέση οξειδώσεως των LDL, καθώς αυτές μεταφέρονται εντός του αρτηριακού τοιχώματος. (Από το Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. Nature 362:801, 1993).




Copyright © 2005 by Elsevier Inc.

**Εικόνα 3:** Η ενδοθηλιακή ισορροπία θρόμβωσης. Το διάγραμμα απεικονίζει τις αντιπηκτικές προϊνωδολυτικές λειτουργίες του ενδοθηλιακού κυττάρου (αριστερά) και προπηκτικές με αντιινωδολυτικές λειτουργίες (δεξιά). Heparan sulfate: θειϊκή ηπαράνη.

### 1.2.2 ΛΕΙΑ ΜΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Το κύτταρο που υπερπλάσσεται στον έσω χιτώνα των αρτηριών για να σχηματίσει τις ενδιάμεσες και προχωρημένες βλάβες της αρτηριοσκληρώσεως, το λείο μυϊκό κύτταρο, προέρχεται αρχικά από το μέσο χιτώνα (19). Παλαιότερα, η μόνη λειτουργία που απέδιδαν στα λεία μυϊκά κύτταρα ήταν η ικανότητά τους να συσπώνται. Κατόπιν έγινε δυνατή η συντήρηση και αναπαραγωγή αμιγών πληθυσμών λείων μυϊκών κυττάρων σε καλλιέργειες και η απόδειξη ότι τα κύτταρα αυτά, όπως και οι ινοβλάστες, είναι από τα κύρια κύτταρα που παράγουν συνδετικό ιστό (20). Τα λεία μυϊκά κύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν διάφορες μορφές κολλαγόνου, πρωτεΐνες ελαστικών ινών και διάφορους τύπους πρωτεογλυκανών (21). Ο κύριος ρόλος των λείων μυϊκών κυττάρων στην πλήρως σχηματισμένη αρτηρία των ενηλίκων είναι πιθανώς η διατήρηση του τόνου του αρτηριακού τοιχώματος με την ικανότητα αυτών να διατηρούν χαμηλού βαθμού συσπάσεις, χαρακτηριστικές των

λείων μυών. Τα λεία μυϊκά κύτταρα απαντούν σε πολυάριθμους αγγειοενεργούς παράγοντες, όπως η αδρεναλίνη και η αγγειοτασίνη, που προκαλούν σύσπαση και αγγειοσύσπαση καθώς και προστακυκλίνη και NO που προκαλούν χάλαση και αγγειοδιαστολή. Τα λεία μυϊκά κύτταρα, όπως και οι ινοβλάστες, περιέχουν ειδικούς υποδοχείς υψηλής συγγένειας για μια σειρά χημικών ουσιών, με τις οποίες συνδέονται ομοιοπολικά. Τέτοιες ουσίες είναι η LDL (22) (η οποία είναι η κύρια χοληστερολούχος λιποπρωτεΐνη του πλάσματος που μετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης), η ινσουλίνη (η οποία εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης), παράγοντες που διεγείρουν την αύξηση, όπως ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (transforming growth factor β, TGF β) (που βοηθάει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων).

Τα λεία μυϊκά κύτταρα φαίνεται ότι σε καλλιέργειες παρουσιάζουν δύο διαφορετικούς φαινοτύπους (23,24). Ο πρώτος από αυτούς, ο συσταλτικός φαινότυπος (contractile phenotype), πιστεύεται γενικά ότι συνδέεται με τη συσπαστικότητα του κυττάρου, επειδή περιέχει άφθονα μυοϊνίδια σε ολόκληρο το κυτταρόπλασμα που αποτελούνται από νημάτια ακτίνης και μυοσίνης. Τα συσταλτά αυτά νημάτια συνδέονται μεταξύ τους και με την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του κυττάρου με πυκνά σωμάτια (dense bodies). Τα κύτταρα αυτά δε φαίνονται ικανά να απαντούν σε μιτογόνα, όπως ο PDGF.

Μετά κατάλληλο ερεθισμό, το λείο μυϊκό κύτταρο χάνει το συσταλτό φαινότυπο και μεταβάλλεται σε κύτταρο με μειωμένο περιεχόμενο μυονηματίων και πλούσια ανάπτυξη αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και συμπλέγματος Golgi. Το κύτταρο αυτό έχει περιγραφεί ως συνθετικός φαινότυπος (synthetic phenotype). Κύτταρα του συνθετικού φαινοτύπου φαίνεται ότι μετέχουν στο σχηματισμό πολυάριθμων εκκρινόμενων πρωτεϊνών, όπως μακρομορίων θεμέλιας ουσίας συνδετικού ιστού.

Τα πλούσια σε συσταλτά στοιχεία λεία μυϊκά κύτταρα απαντούν σε παράγοντες που προκαλούν αγγειοσύσπαση, όπως η ενδοθηλίνη (ET), οι κατεχολαμίνες και αγγειοτασίνη II (AII). Παράγοντες που προκαλούν αγγειοδιαστολή, όπως η προσταγλανδίνη E, η προστακυκλίνη ($PGI_2$), τα νευροπεπτίδια (neuropeptides), οι λευκοτριένες και το NO, ασκούν επίσης έντονες επιδράσεις επί των κυττάρων αυτών.

Όταν τα κύτταρα είναι πλούσια σε αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και σύμπλεγμα Golgi (συνθετική κατάσταση), εκφράζουν γονίδια για μια σειρά αυξητικών-ρυθμιστικών μορίων και κυτοκινών. Σε επαρκή βλάβη των λείων μυϊκών κυττάρων ελευθερώνονται αυξητικοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας των

ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF). Με τον τρόπο αυτό διεγείρονται γειτονικά λεία μυϊκά κύτταρα και το προσκείμενο ενδοθήλιο. Τα λεία μυϊκά κύτταρα συμβάλλουν κατά κύριο λόγο στην επανορθωτική ινοϋπερπλαστική διαδικασία της αναπτύξεως των βλαβών της αρτηριοσκληρώσεως.

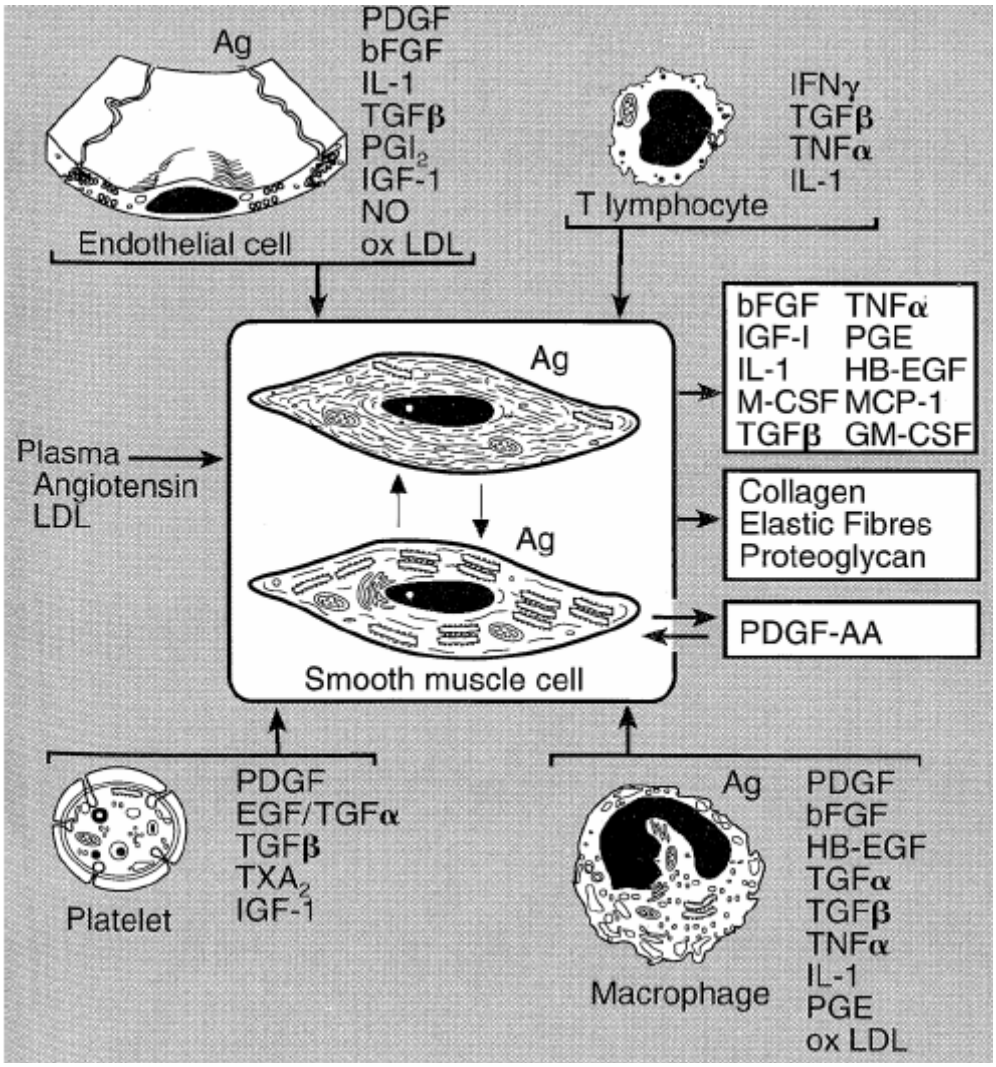
Έχει υποστηριχθεί ότι η φαινοτυπική διαφοροποίηση του λείου μυϊκού κυττάρου είναι σημαντική από άποψη ικανότητας απαντήσεως σε μιτογόνα, όπως στον PDGF, και έτσι στο σχηματισμό των υπερπλαστικών βλαβών της αθηροσκληρύνσεως. Τα λεία μυϊκά κύτταρα του συσταλτικού φαινοτύπου έχουν περιγραφεί ως μη αντιδρώντα (nonresponsive) στα μιτογόνα, ενώ εκείνα του συνθετικού φαινοτύπου έχουν περιγραφεί ως αντιδρώντα (responsive) (23,24). Για να σχηματιστούν οι αρτηριοσκληρωτικές βλάβες, λεία μυϊκά κύτταρα πρέπει- και στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό συμβαίνει- να μεταναστεύουν από το μέσο στον έσω χιτώνα, όπου αντιδρούν στα μιτογόνα. Συνεπώς, ο έλεγχος της φαινοτυπικής καταστάσεως των λείων μυϊκών κυττάρων έχει μεγάλη σημασία στην κατανόηση της αθηρογένεσης.

Τα λεία μυϊκά κύτταρα προέρχονται τοπικά από το παρέγχυμα των επί μέρους οργάνων κατά την εμβρυογένεση, σε αντίθεση με το ενδοθήλιο, το οποίο φαίνεται ότι προέρχεται από τα πρωτοεμβρυϊκά αγγεία (embryonic vasculature) που εισχωρούν στο όργανο (25). Ως αποτέλεσμα αυτού, τα λεία μυϊκά κύτταρα σε διάφορες αρτηρίες αντιδρούν διαφορετικά στους διάφορους αγωνιστές με τους οποίους έρχονται σε επαφή, γεγονός που ίσως εν μέρει εξηγεί τη διαφορετική απάντηση των διάφορων αρτηριακών δικτύων στα τοπικά ερεθίσματα που είναι συνυφασμένα με τη διεργασία της αθηρογενέσεως (26).

Για να σχηματιστούν αρτηριοσκληρυντικές βλάβες τα λεία μυικά κύτταρα του συνθετικού φαινοτύπου μεταναστεύουν από τον μέσο στον έσω χιτώνα των αρτηριών υπό την επίδραση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων όπως αυξητικός παράγων προερχόμενος από τα αιμοπετάλια (platelet derived growth factor, PDGF), ενδοθηλίνη-1 (ET-1), θρομβίνη, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (fibroblast growth factor FGF) και ιντερλευκίνη-1 (IL-1). Η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός αναστέλλονται από την θειική ηπαρίνη, το νιτρικό οξείδιο (NO), τον TGF-β. Στη μετανάστευση θα μπορούσαν να λαμβάνουν μέρος και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) που αφαιρούν τη μεμβράνη γύρω απ' τα VSMCs και διευκολύνουν την επαφή τους με τη διάμεση θεμέλια ουσία. Αυτό θα μπορούσε να αλλάζει τον ακίνητο συσταλτό φαινότυπο των VSMCs σε κύτταρα ικανά να μεταναστεύσουν και να πολλαπλασιαστούν(27).

Τα λεία μυϊκά κύτταρα αναπτύσσονται με την επίδραση της αγγειοτασίνης ΙΙ και παράγουν, όπως και οι ινοβλάστες, εξωκυττάρια θεμέλια ουσία δηλ. κολλαγόνο, ελαστίνη και πρωτεογλυκάνες, κι έτσι σχηματίζεται το ινώδες κάλυμμα της αθηρωματικής πλάκας. Τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγουν ιντερφερόνη-γ η οποία, αντίθετα με την αγγειοτασίνη ΙΙ, παρεμποδίζει την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας από τα VSMCs.

Τα VSMCs είναι επίσης ικανά για λειτουργίες που τυπικά αποδίδονται σε άλλα κύτταρα. Όπως τα μακροφάγα, τα VSMCs μπορούν να εκφράσουν μια ποικιλία υποδοχέων για την πρόσληψη λιπιδίων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, συμμετέχοντας στην πρώιμη συσσώρευση λιπιδίων στην πλάκα. Τα VSMCs μπορούν επίσης να εκφράσουν μια ποικιλία μορίων προσκόλλησης όπως VCAM-1 και ICAM-1 στα οποία τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα μπορούν να προσκολληθούν και να μεταναστεύσουν μέσα στο αγγειακό τοίχωμα. Επιπροσθέτως, διαμέσου αυτών των μορίων τα VSMCs μπορούν επίσης να σταθεροποιήσουν αυτά τα κύτταρα κατά της απόπτωσης, συνεισφέροντας έτσι στην πολυκυτταρικότητα της πλάκας. Όπως πολλά κύτταρα μέσα στην αναπτυσσόμενη πλάκα έτσι και τα λεία μυϊκά κύτταρα επίσης παράγουν πολλές κυτοκίνες όπως PDGF, TGF-b, INF-γ και MCP-1 που όλα συνεισφέρουν στην έναρξη και την διασπορά της φλεγμονώδους απάντησης.




**Εικόνα 4:** Στο συνθετικό φαινότυπο υποτίθεται ότι τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορεί να σχηματίσουν μόρια συνδετικού ιστού, καθώς και αυξητικούς παράγοντες, όπως PDGF-AA και ερεθίζουν τόσο ευατά, όσο και τα γειτονικά τους κύτταρα. Στις αλληλεπιδράσεις τους με το υπερκείμενο ενδοθήλιο και τα γειτονικά Τ- λεμφοκύτταρα, αιμοπετάλια και μακροφάγα, τα λεία μυϊκά κύτταρα απαντούν σε διάφορες κυτοκίνες, αυξητικά-ρυθμιστικά μόρια και αγγειοδιασταλτικές και αγγειοσυσπαστικές ουσίες που παράγονται από τα κύτταρα αυτά, καθώς και από ουσίες του πλάσματος, όπως την αγγειοτασίνη. Έτσι, τα γονίδια που εκφράζονται σε διάφορες φαινοτυπικές καταστάσεις από τα λεία μυϊκά κύτταρα (αναφέρονται στα δεξιά του κυττάρου στην εικόνα), καθώς και τα γονίδια που εκφράζονται από τα γειτονικά κύτταρα (αναφέρονται κοντά σε κάθε κύτταρο) στο τοίχωμα της αρτηρίας, που προέρχονται από τις κυτταρικές αυτές αλληλεπιδράσεις, προσδιορίζουν αν η βλάβη θα προχωρήσει ή θα υποστρέψει. (Από το Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. Nature 362:801, 1993).

### 1.2.3 ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

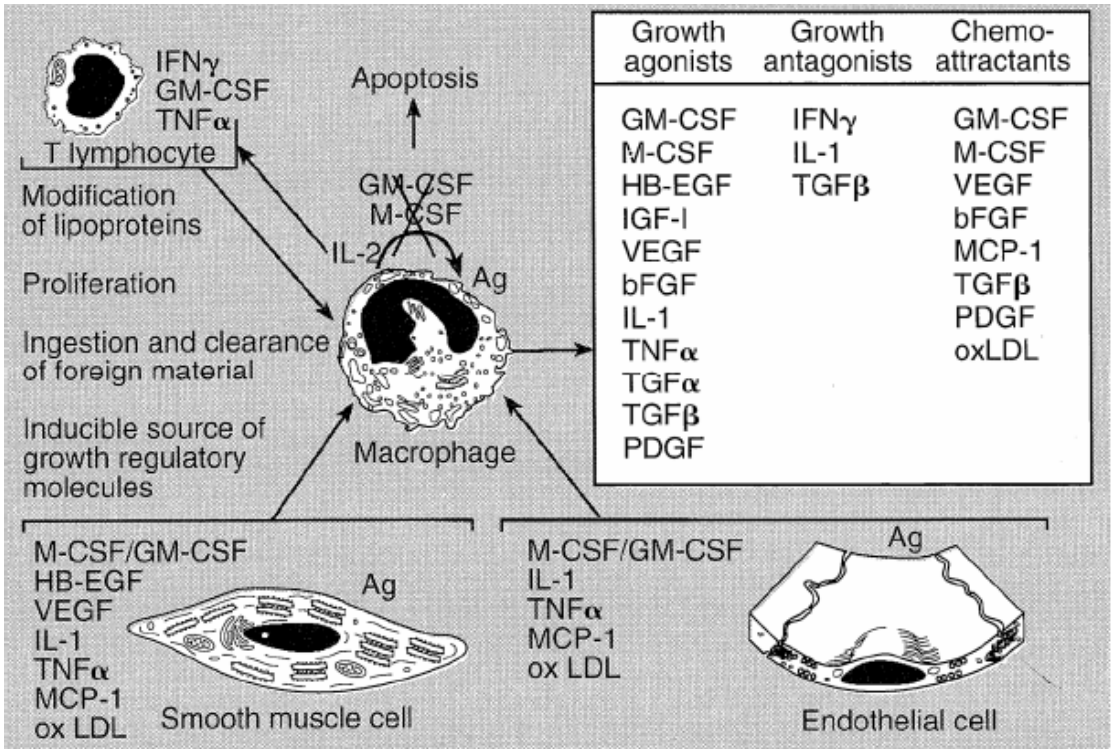
Τα μακροφάγα σε όλους τους ιστούς, ανεξάρτητα αν αυτά είναι μόνιμα μακροφάγα των ιστών ή είναι κύτταρα που έφθασαν εκεί κατά τη διάρκεια φλεγμονώδους απαντήσεως, προέρχονται σε κάποια φάση της ζωής τους από τα μονοκύτταρα του κυκλοφορούντος αίματος (28). Όταν το μονοκύτταρο εισέρχεται σε έναν ιστό φαίνεται ότι αποκτά χαρακτηριστικά ιδιάζοντα στο φιλοξενούντα ιστό. Στις περισσότερες θέσεις φλεγμονής το μακροφάγο δρα ως καθαριστής (scavenger cell) προς απομάκρυνση ξένων ουσιών με τη διαδικασία της φαγοκυτταρώσεως και της ενδοκυττάριας υδρολύσεως, και επίσης δρα ως δεύτερη γραμμή άμυνας μετά τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα εναντίον μικροβίων (29).

Ως κύτταρο καθαριστής, το μακροφάγο προσπαθεί να αφαιρέσει βλαβερές ουσίες, όπως oxLDL, μέσω υποδοχέων καθαριστών (scavenger receptors) και μπορεί να οξειδώσει τις LDL με τα ένζυμα λιποξυγονάσες (π.χ. τη 15-λιποξυγονάση) (30). Οι παραγόμενες oxLDL προσλαμβάνονται από τα ίδια ή από γειτονικά μακροφάγα. Έχει αναγνωριστεί ότι στις βλάβες της αρτηριοσκληρώσεως πολλαπλασιάζονται όχι μόνο τα λεία μυϊκά κύτταρα αλλά και τα μακροφάγα. Ο πολλαπλασιασμός των μακροφάγων είναι πηγή συσσωρεύσεως κυττάρων εντός των βλαβών το ίδιο μεγάλη με-αν όχι μεγαλύτερη από- τα λεία μυϊκά κύτταρα. Έτσι, οι παράγοντες που είναι συνυφασμένοι με την εναλλαγή (turnover), τον πολλαπλασιασμό και τον προγραμματισμένο θάνατό τους (απόπτωση), είναι όλοι σημαντικοί για τον καθορισμό της συσσωρεύσεως των μακροφάγων.

Τα μακροφάγα εκκρίνουν μεγάλο αριθμό βιολογικά σημαντικών ουσιών, όπως χημειοτακτικούς παράγοντες σαν τη λευκοτριένη B4 (31) και την ιντερλευκίνη 1 (32), και μεταβολίτες του οξυγόνου, όπως ανιόν υπεροξειδίου (33), που είναι τοξικό για άλλα κύτταρα. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα μακροφάγα συνθέτουν και εκκρίνουν τουλάχιστον 6 διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες (34). Αυτοί είναι: α) ο PDGF (35), αυξητικός παράγοντας για τα μεσεγχυματικά κύτταρα, όπως τα λεία μυϊκά κύτταρα και τους ινοβλάστες, β) η ιντερλευκίνη 1, μια κυτοκίνη που προκαλεί έκφραση του γονιδίου PDGF στους ινοβλάστες (36) γ) τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF) (37), ένα μιτογόνο για τα ενδοθηλιακά κύτταρα και έτσι δυνητικά σημαντικό αγγειογόνο παράγοντα, δ) τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) και όμοια προς τον EGF μόρια (π.χ. μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας α [TGF α]), που και οι δύο συνδέονται

με τον ίδιο υποδοχέα και διεγείρουν την αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων, ε) τον PDGF β, μια ουσία που συμμετέχει, κατά συνεργικό τρόπο με ορισμένους από τους αναφερθέντες αυξητικούς παράγοντες, στην προαγωγή του πολλαπλασιασμού πολλών κυττάρων σε διαφορετικούς ιστούς και σε πολλές περιπτώσεις στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και τέλος, στ) τον M-CSF, έναν αυξητικό παράγοντα για τα μονοκυτταρικά μακροφάγα (38).

Τα μακροφάγα, όπως και τα λεία μυϊκά κύτταρα, αποτελούν μείζονα πηγή αφροκυττάρων στις βλάβες της αθηροσκληρύνσεως. Στην πραγματικότητα, είναι τα κύρια κύτταρα της λιπώδους ραβδώσεως (fatty streak) που είναι η πρώτη βλάβη της αρτηριοσκληρύνσεως. Συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων με μορφή σταγονιδίων που περιέχουν μεγάλες ποσότητες εστέρων χοληστερόλης.




**Εικόνα 5:** Τα αμφίδρομα βέλη μεταξύ Τ-λεμφοκυττάρου και μακροφάγου υπαινίσσονται ότι κάποια μορφή άνοσης απαντήσεως ενδέχεται να συμβαίνει κατά τη διάρκεια της αθηρογενέσεως. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων Τ και μακροφάγων μπορεί να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό των κυτταρικών αυτών τύπων μέσω IL-2 και CSF, αντίστοιχα. Όλα τα κύτταρα αυτά με τα οποία τα μακροφάγα αλληλεπιδρούν, συγκεκριμένα τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και το ενδοθήλιο, μπορεί να παρουσιάσουν CSF στα μακροφάγα προς διατήρηση της βιωσιμότητας του κυττάρου και πρόληψη της αποπτώσεως και του κυτταρικού θανάτου και συμμετέχουν στην παραπέρα ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των μακροφάγων. Επιπλέον, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν αντιγόνα (Ag) στην επιφάνειά τους και εκκρίνουν χημειοτακτικές ουσίες για τα μακροφάγα, περιλαμβανομένων MCP-1 και oxLDL, καθώς και παράγοντες που τροποποιούν το μεταβολισμό των μακροφάγων, όπως IL-1 ή TNFα.
Όταν τα μακροφάγα ενεργοποιηθούν, παράγουν εξαιρετικά μεγάλο αριθμό βιολογικά ενεργών μορίων, μερικά από τα οποία αναφέρονται στον ένθετο πίνακα, σε σχέση με την ικανότητά τους να προκαλούν ή να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ενδοθηλίου, των λείων μυϊκών κυττάρων ή των ίδιων των μακροφάγων, καθώς και σε σχέση με την ικανότητά τους να παράγουν χημειοτακτικές ουσίες για καθένα από τους κυτταρικούς αυτούς τύπους. (Από το Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. Nature 362:801, 1993).

### 1.2.4 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Αν και ενδέχεται να μην εμπλέκονται στη γένεση όλων των βλαβών, τα αιμοπετάλια σαφώς ενοχοποιούνται στη γένεση ορισμένων βλαβών της αρτηριοσκληρύνσεως. Ωστόσο, τα αιμοπετάλια είναι επίσης σημαντικά επειδή εμπλέκονται σταθερά σε ένα από τα κύρια επακόλουθα της αρτηριοσκληρύνσεως, τη θρόμβωση. Συνήθως πρόκειται για τοιχωματικό ή αποφρακτικό θρόμβο ή και τα δύο που οδηγεί σε έμφραγμα. Τα αιμοπετάλια, παρόλο που δεν συνθέτουν σχεδόν καμία πρωτεΐνη, περιέχουν αποθηκευμένα στα κοκκία τους πολυάριθμα προκατασκευασμένα εξαιρετικά δραστικά μόρια.

Μεταξύ αυτών είναι μια σειρά παράγοντες που παίρνουν μέρος στον καταρράκτη της πήξεως και, επιπλέον, τουλάχιστον τέσσερεις ισχυροί αυξητικοί παράγοντες ή μιτογόνα. Είναι οι ίδιοι αυξητικοί παράγοντες που παράγονται και από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, συγκεκριμένα ο PDGF, ο FGF, ο EFG, και οι TGFα και TGFβ (39). Όταν το αιμοπετάλιο εκτίθεται σε υποστρώματα που προκαλούν συγκόλληση, συσσώρευση και αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων, οι παραπάνω αυξητικοί παράγοντες δυνητικά ελευθερώνονται και έτσι προκαλούν υπερπλαστική απάντηση πρακτικά όλων των κυττάρων ενός δεδομένου ιστού. Με άλλα λόγια, τα αιμοπετάλια περιέχουν αυξητικούς παράγοντες δυνητικά ερεθιστικούς για όλους τους τύπους κυττάρων ενός ιστού, στον οποίο συμβαίνει η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και αντίδραση απελευθερώσεως. Έτσι, σε θέσεις βλάβης, στις οποίες συμβαίνουν έκθεση στο κολλαγόνο, σχηματισμός θρομβίνης και ινώδους ή ελευθέρωση διφωσφορικής αδενοσίνης, μπορεί να συμβεί συσσώρευση αιμοπεταλίων και θρόμβωση, η οποία οδηγεί στην ελευθέρωση πολυάριθμων αγγειοενεργών ερεθιστικών και υπερπλαστικών παραγόντων που εμπεριέχονται στα αιμοπετάλια. Καθένας από τους παράγοντες αυτούς παίζει σημαντικό ρόλο στη διέγερση μιας πρώιμης αγγειοσυσπάσεως και υπερπλαστικής απαντήσεως (40). Η πρώιμη αυτή επανορθωτική απάντηση στη βλάβη ενδέχεται να είναι σημαντική και για την έναρξη των βλαβών της αρτηριοσκληρύνσεως.

Πολυάριθμοι παράγοντες αυξάνουν in vitro την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η οποία ενδέχεται να έχει βαθιά επίδραση στο σχηματισμό και στην πρόοδο των βλαβών.

Η αύξηση των επιπέδων των κατεχολαμινών του αίματος, όπως της νοραδρεναλίνης, ενδέχεται να συνδέεται με αύξηση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων και της ικανότητας προς συσσώρευση (41). Εκτός αυτού, το χρόνιο συγκινησιακό stress, το

ιστορικό καπνίσματος και το έντονο οικογενειακό ιστορικό αυξημένης τάσεως των αιμοπεταλίων προς συσσώρευση έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια σε ασθενείς με νόσο των στεφανιαίων αρτηριών και έτσι ελαττώνουν την επιβίωση των αιμοπεταλίων (42, 43).

Ένα λιπιδικό σωματίδιο, η α-λιποπρωτεΐνη (Lp[a]), ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση και στην πρόοδο της αρτηριοσκληρύνσεως. Η Lp(a) συνίσταται από σωματίδιο LDL με πρωτεΐνη εξαιρετικά όμοια προς το πλασμινογόνο συνδεδεμένη με ομοιοπολικό δεσμό με την LDL. Έχει υποστηριχθεί ότι τα υψηλά επίπεδα Lp(a) παρεμβαίνουν ανταγωνιζόμενα το πλασμινογόνο δημιουργώντας έτσι υπερθρομβωτική κατάσταση. Η δυνητική θρομβογονικότητα των αυξημένων επιπέδων της Lp(a) δεν έχει για την ώρα αποδειχθεί αιτία αυξημένης συχνότητας εμφράγματος του μυοκαρδίου. Παρόλα αυτά, σε αναδρομικές μελέτες βρέθηκε ότι παιδιά με αυξημένα επίπεδα Lp(a) παρουσίασαν αυξημένη συχνότητα εμφράγματος του μυοκαρδίου σε νεαρή ηλικία (44, 45). Έτσι, τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση και δυνητικά κρίσιμης σημασίας ρόλο στην πρόοδο και στα κλινικά επακόλουθα των προχωρημένων βλαβών που είναι επιρρεπείς σε ρήξη και θρόμβωση.

### 1.2.5 Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα λεμφοκύτταρα-Τ, τόσο τα CD-8+ όσο και τα CD-4+, έχουν παρατηρηθεί σε όλες τις φάσεις της αθηρογενέσεως σε ανθρώπους και σε πιθήκους (46). Η συμμετοχή τους στις βλάβες της αρτηριοσκληρύνσεως στηρίζει την άποψη ότι οι βλάβες αυτές ενδέχεται, τουλάχιστον εν μέρει, να είναι αποτέλεσμα άνοσης ή πιθανώς αυτοάνοσης απαντήσεως. Η πειραματικά προκαλούμενη αυτοανοσία αποδείχθηκε ότι προκαλεί βαριές υπερπλαστικές βλάβες αρτηριοσκληρύνσεως σε κονίκλους (47). Στον άνθρωπο, τα απορριφθέντα καρδιακά μοσχεύματα έχουν χαρακτηριστικά εκτεταμένες αποφρακτικές βλάβες αρτηριοσκληρύνσεως στις στεφανιαίες αρτηρίες. Ωστόσο, αντίθετα προς τις βλάβες της κοινής αρτηριοσκληρύνσεως, η πλειονότητα των οποίων είναι έκκεντρες, οι παρατηρούμενες στα απορριφθέντα καρδιακά μοσχεύματα είναι συγκεντρικές. Η φύση του ή των αντιγόνων που παίζουν ρόλο στην κοινή αρτηριοσκλήρυνση είναι άγνωστη. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ Τ-λεμφοκυττάρων-ενεργοποιημένων μακροφάγων που αμφότερα αφθονούν στις βλάβες υπαινίσσοναι ότι η παρουσίαση αντιγόνων και η ελευθέρωση κυττοκινών και αυξητικών παραγόντων μεταξύ ενεργοποιημένων μακροφάγων και Τ-λεμφοκυττάρων παίζουν σημαντικό ρόλο στη διεργασία αυτή (48).

Έχει αποδειχθεί ότι οι oxLDL ενεργούν ως ένα από τα δυνητικά μείζονα αντιγόνα που διεγείρουν τις αλληλεπιδράσεις μακροφάγων-λεμφοκυττάρων-Τ. Πολλά κύτταρα Τ και βλάβες αποδεικνύεται ότι είναι ενεργοποιημένα με βάση την έκφραση από αυτά του αντιγόνου ιστοσυμβατότητας HLA-DR. Παρ'όλα αυτά, κλωνική έκπτυξη (clonal expansion) των λεμφοκυττάρων αυτών δε φαίνεται να λαμβάνει χώρα (49). Αν οι oxLDL αποδειχθεί ότι είναι το αντιγόνο που κυρίως ευθύνεται για την ενεργοποίηση των κυττάρων Τ, αυτό θα δώσει μια νέα προσέγγιση της θεραπείας και της άνοσης απαντήσεως στη διεργασία της αθηρογενέσεως.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.**

## ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

### 2.1 ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ, ΜΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΠΟΨΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ.

Οι μελέτες που αφορούν την παθογένεια της αρτηριοσκλήρυνσης μπήκαν σε καινούργια βάση στην καμπή του 21$^{ου}$ αιώνα. Ο 20$^{ος}$ αιώνας ήταν η εποχή της χοληστερόλης και των λιποπρωτεϊνών, όπως συναγόταν από ένα αριθμό κλινικών μελετών που διεξήχθηκαν σε μεγάλη κλίμακα, και έδειξαν αναμφίβολα ότι η ομαλοποίηση της υπερχοληστεριναιμίας ελάττωνε σημαντικά την επίπτωση και τη θνησιμότητα της στεφανιαίας νόσου (50, 51 ). Περίπου στα τέλη της δεκαετίας του 90, η αρτηριοσκλήρυνση θεωρείτο ότι αναπτύσσεται ως απάντηση σε βλάβη που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια των αγγείων (52). Εντούτοις, άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν τις πρώιμες αρτηριοσκληρυντικές αλλοιώσεις ήταν στην πραγματικότητα άθικτα (53). Έτσι η αρτηριοσκλήρυνση είχε θεωρηθεί αρχικά ως εκφυλιστική νόσος (54, 55, 3). Εντούτοις, περίπου 20 χρόνια πριν, οι μελέτες άρχισαν να επικεντρώνονται σε ευρεία κλίμακα σε έναν άλλο παθογενετικό μηχανισμό της αρτηριοσκλήρυνσης, που δεν είχε ληφθεί υπόψη έως τότε, και είναι η φλεγμονώδης διαδικασία.

***Οι πρώτες ενδείξεις***

Το 1986, με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, αποδείχτηκε ότι τα μικρά κύτταρα με τους στρογγυλούς πυρήνες που είναι παρόντα σε αθηρωματικές πλάκες, κι ήταν γνωστά παλιότερα ως μικρά μονοπύρηνα, είναι Τ- λεμφοκύτταρα (56). Αρκετά χρόνια μετά δείχτηκε ότι αυτά τα λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ως αντιγόνα τα οξειδωμένα μόρια των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (low-density lipoprotein LDL)- ox-LDL (57).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε η συσχέτιση ανάμεσα στην αρτηριοσκλήρυνση και την παρουσία τουλάχιστον ενός λοιμογόνου μικροοργανισμού, του *Chlamydia pneumonia* (58-59). Αυτό έγειρε το ερώτημα αν η φλεγμονώδης διεργασία συμμετέχει στην αρτηριοσκλήρυνση. Υποθέσεις αυτού του είδους αρχικά έγιναν δεκτές με μεγάλο σκεπτικισμό γιατί δεν υπήρχαν αδιαμφισβήτητες ενδείξεις σημαντικού ρόλου της φλεγμονής στην αρτηριοσκλήρυνση. Αυτές τις ενδείξεις τις παρείχε μια νέα τεχνική με στόχο το γονιδίωμα για την ανακάλυψη της οποίας οι: Mario R.Cappecchi (Italy),

Martin J.Evans (United Kingdom) and Oliver Smithies (USA) κέρδισαν το βραβείο Nobel στη Φυσιολογία της Ιατρικής το 2007.

***Επιπλέον ενδείξεις για την παρουσία φλεγμονής στην αρτηριοσκλήρυνση***

Το νεότερο μοντέλο της αρτηριοσκλήρυνσης επέτρεψε στους ερευνητές να δημιουργήσουν ποντίκια με εξουδετερωμένο γονίδιο απολιποπρωτεΐνης Ε (apo-E knockout mice), ένα ιδανικό ζωικό μοντέλο προς δοκιμή της επίδρασης μοναδικών πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απάντηση, πάνω στην αρτηριοσκλήρυνση. Αυτές οι μελέτες έδειξαν για παράδειγμα ότι η έλλειψη μιας μόνο κυτοκίνης- ιντερφερόνης-γ (IFN-γ)- ελάττωσε την αρτηριοσκλήρυνση ακόμα και 60% (60). Επίσης σε αυτό το ζωικό μοντέλο παρατηρήθηκε υπερέκφραση μορίων προσκόλλησης όπως vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM 1) και intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1) σε θέσεις με αρτηριοσκληρυντικές αλλοιώσεις (61). Η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων καταδείχθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο των αρτηριοσκληρωτικών βλαβών (62, 63). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η εξουδετέρωση της ιντερλευκίνης-18 ελάττωνε την αρτηριοσκλήρυνση κατά 35% (64, 65).

Η αναστολή του σήματος CD40 ελάττωνε την αρτηριοσκλήρυνση (66). Αυτό εξηγείτο από το γεγονός ότι η σύνδεση του μορίου CD40 (μέλος της υπεροικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor-α, TNF-α) που βρίσκεται στην αθηρωματική πλάκα, στα επιθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυικά κύτταρα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και τα αιμοπετάλια- με τον CD40L ενεργοποιεί έναν αριθμό μεταγραφικών παραγόντων:NF-kB, AP-1, STAT-1, ή Egr-1. Επομένως, αυτό επηρεάζει για παράδειγμα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία κατά συνέπεια αποκτούν προφλεγμονώδη και προαρτηριοσκληρυντικό φαινότυπο και οδηγεί στην έκφραση μορίων προσκόλλησης και ιστικού παράγοντα (tissue factor) στην επιφάνειά τους. Αυτό δημιουργεί νέες πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις, που συνίστανται σε αναστολή του μονοπατιού CD40-CD40L (67-69). Στα ποντίκια την επίδραση του CD40 επίσης ανταγωνίζεται ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (transforming growth factor-β, TGF-β) (70).

Τελικά, στα apo-E knockout ποντίκια με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (severe combined immunodeficiency SCID) η αρτηριοσκλήρωση ελαττώθηκε 70% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control group), εξαιτίας του σημαντικά μικρότερου

αριθμού λεμφοκυττάρων σε ποντίκια με SCID. Αποδείχθηκε ότι η μεταφορά Τ-λεμφοκυττάρων σε αυτά τα ποντίκια χειροτερεύει την αρτηριοσκλήρωση κατά 164% (71).

Αυτά και άλλα γεγονότα έκαναν τους ερευνητές να συνειδητοποιήσουν χωρίς να αμφιβάλλουν ότι η φλεγμονή ήταν ουσιαστική για την αρτηριοσκλήρωση. Επομένως, το 1999, πριν το θάνατό του ο Russell Ross (ο συγγραφέας της προηγούμενης θεωρίας της αρτηριοσκλήρωσης ως χρόνιας αντίδρασης σε βλάβη) επισήμως διακήρυξε ότι η αρτηριοσκλήρωση είναι μια φλεγμονώδης νόσος (72).

## 2.2 ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

Ένα γεγονός που προάγει την αρτηριοσκλήρυνση είναι η σύνδεση λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υποδοχείς low density lipoprotein receptor (LDL-R) στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η μερική οξείδωσή τους σε αυτά κι η δίοδός τους, με παθητική διάχυση, πιθανώς μέσω των χασματικών συνδέσεων (gap junctions) ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στον έσω χιτώνα των αρτηριών (intima). Το φαινόμενο της συσσώρευσης low density lipoprotein (LDL) στην intima είναι πιο έντονο όταν τα επίπεδα της LDL στο αίμα είναι υψηλά.

Η διαπερατότητα του ενδοθηλίου σε στοιχεία του αίματος και στην LDL είναι αυξημένη στις διακλαδώσεις του αρτηριακού δικτύου και στις καμπές των αρτηριών όπου η αιμοδυναμική πίεση είναι αυξημένη και υφίστανται διατμητικές τάσεις (shear stress). Οι διατμητικές τάσεις στις θέσεις αυτές προκαλούν και αλλαγές στη μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Εκεί δηλαδή τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πολυγωνικά και χωρίς συγκεκριμένο προσανατολισμό εν αντιθέσει με το υπόλοιπο δίκτυο που είναι ελλειπτικά και με κατεύθυνση ίδια με της αιματικής ροής. Λόγω της αυξημένης διαπερατότητας στην LDL (73), οι περιοχές αυτές παρουσιάζουν πρώιμα αρτηριοσκληρωτικές βλάβες.

Η σύνδεση της απολιποπρωτεΐνης Β ( apo-B) της LDL με τις πρωτεογλυκάνες διατηρεί την LDL στην intima (74).

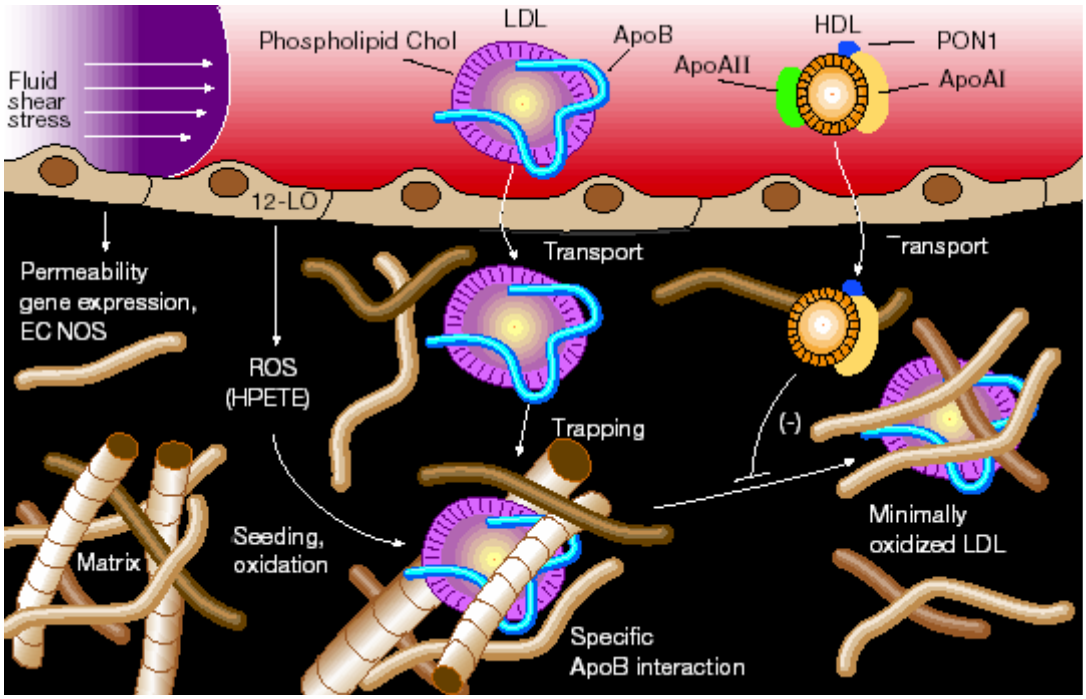
Ένζυμα όπως η 12-15 λιποξυγενάση του ενδοθηλίου, συμβάλλουν στη σύνθεση ενεργού οξειδωτικού μορίου ( ROS) που προκαλεί οξείδωση της LDL. Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν έχουν 12/15 λιποοξυγενάση έχουν αξιοσημείωτη ελάττωση των αρτηριοσκληρωτικών βλαβών που σημαίνει ότι το ένζυμο αυτό είναι μια σημαντική πηγή ROS για την οξείδωση της LDL(75). Ένα άλλο ένζυμο, η μυελοϋπεροξειδάση προκαλεί οξείδωση της LDL μέσω παραγωγής υδροχλωρικού

οξέως και ρίζας tyrosyl (76). Η σφιγγομυελινάση προκαλεί συσσωμάτωσή της LDL (77) ενώ άλλα ένζυμα προκαλούν λιπόλυση, πρωτεόλυση και γλυκοζυλίωσή της.

Η οξείδωση της LDL είναι η πιο σημαντική διεργασία για την αθηρογένεση γιατί είναι απαραίτητη για την γρήγορη πρόσληψη της LDL από τα μακροφάγα τα οποία έτσι μετασχηματίζονται σε αφρώδη κύτταρα, που είναι το κύριο συστατικό των πρώιμων αθηρωματικών βλαβών.

Η ox-LDL δεν είναι μόνο αθηρογενετική αλλά αρκετοί από τους νέους επιτόπους που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης είναι ανοσογενετικοί και το αποτέλεσμα είναι η γένεση αυτοαντισωμάτων. Τα αυτοαντισώματα στην ox-LDL βρίσκονται μέσα στις αθηρωματικές πλάκες και σε φαινομενικά υγιή άτομα, καθώς και ασθενείς με ποικίλες εκδηλώσεις καρδιαγγειακής νόσου. Αν και υπάρχουν αλληλοαντικρουόμενες απόψεις οι συνολικές ενδείξεις συνηγορούν στην αντίληψη ότι τα IgG αντισώματα έναντι της ox-LDL συσχετίζονται με προαθηρογενετικές ιδιότητες και τα IgM αυτοαντισώματα στην ox-LDL με αθηροπροστατευτκές. Δεν έχει ακόμα εντελώς καθοριστεί αν αυτά τα αυτοαντισώματα έχουν ρυθμιστικό ρόλο ή απλώς αντανακλούν την αθηρογένεση(79).

Σε αντίθεση με την LDL, η high density lipoprotein (HDL) είναι ένας ισχυρός προστατευτικός παράγοντας κατά της αρτηριοσκλήρυνσης γιατί συμβάλει στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τους ιστούς και εμποδίζει την οξείδωση της LDL. Η αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται εν μέρει σε ένα προσθετικό μόριο, την serum paraoxonase (μια εστεράση) η οποία μπορεί να αποικοδομεί ενεργά φωσφολιπίδια(91,92). Τα ROS παράγουν οξειδωμένα φωσφολιπίδια και οξειδωμένες στερόλες που ελαττώνουν την ικανότητα της HDL να προστατεύει από ανεπιθύμητη οξείδωση μορίων. Σε ζωικά μοντέλα με δυσλιπιδαιμία, διαβήτη, αγγειακή φλεγμονή και χρόνια απόρριψη, παρατηρείται ότι ελαττώνοντας την οξείδωση και τη φλεγμονή υποβοηθείται η ανάκτηση του προστατευτικού ρόλου της HDL. Ένας τρόπος να επιτευχθεί αυτό είναι η χρήση μιμητικών πεπτιδίων απολιποπρωτεΐνης A-I που απομακρύνει τα οξειδωτικά προϊόντα από τις λιποπρωτεϊνες και τις κυτταρικές μεμβράνες επαναφέροντας τη φυσιολογική δομή και λειτουργία της LDL και της HDL (80).

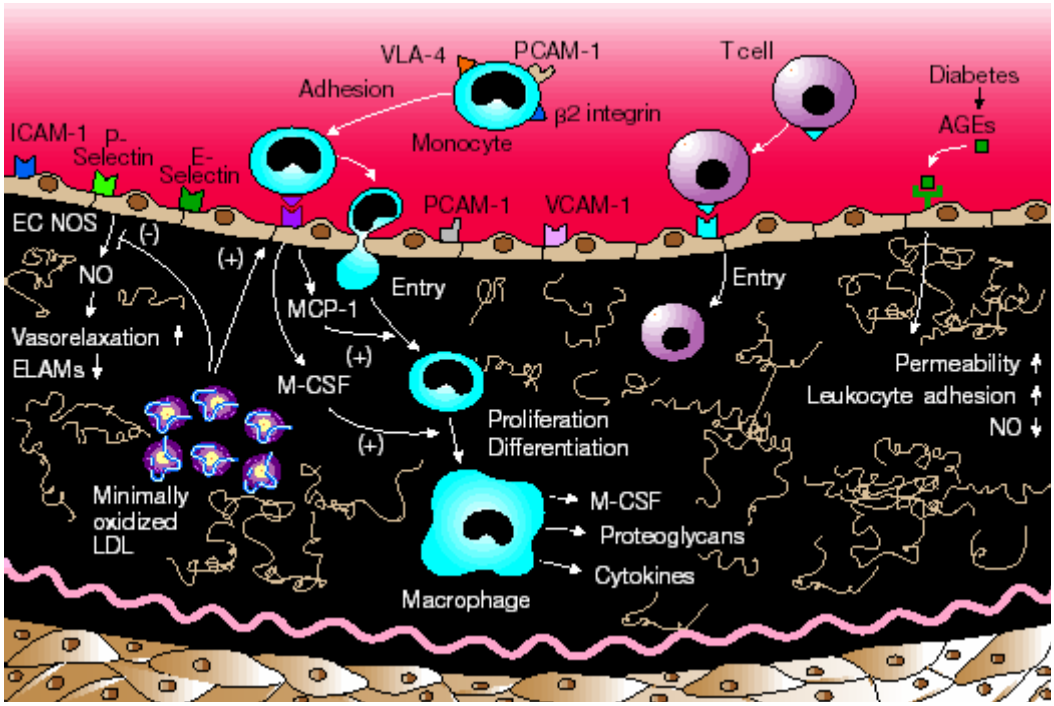



**Εικόνα 6:** Έναρξη της βλάβης. Τα αγγειακά κύτταρα που συνήθως αναπτύσσεται η βλάβη είναι τα σημεία όπου στα ενδοθηλιακά τους κύτταρα εξασκούνται αιμοδυναμικές πιέσεις. Αυτό επηρεάζει τη διαπερατότητα του ενδοθηλιακού φραγμού καθώς και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), όπως αυτής της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide synthase, NOS). Ένα σημαντικό συμβάν έναρξης της βλάβης, είναι η κατακράτηση της LDL στην intima καθώς επίσης και της απολιποπρωτεΐνης-Β (apolipoprotein-B, apoB), ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους με μόρια της εξωκυττάριας ουσίας. Η LDL υφίσταται οξείδωση από ενεργά οξειδωτικά μόρια (reactive oxygen species: ROS), όπως το HPETE, προϊόν της 12/15 λιποξυγενάσης (12/15 lipoxygenase, 12-LO). Η οξείδωση της LDL καταστέλλεται από την HDL, η οποία περιέχει στο μόριό της την αντιοξειδωτική πρωτεΐνη παραοξονάση (paraoxonase: PON1).

## 2.3 ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Η αρτηριοσκλήρωση χαρακτηρίζεται από είσοδο μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων στην intima. Οι LDL εμπλέκονται στην προσκόλληση των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων του αίματος και την αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος στα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα του αίματος, αυξάνοντας την έκφραση στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων της E- selectin (η οποία συνδέεται με την L- selectin, το LFA-1 και το PSGL-1) της P-selectin (η οποία συνδέεται με το PSGL-1) του intercellular cell adhesion molecule-1

(ICAM-1) (που συνδέεται με το LFA-1) και του vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (που συνδέεται με το VLA-4).




**Εικόνα 7:** Φλεγμονή. Μία μικρή ποσότητα οξειδωμένης LDL επάγει την παραγωγή από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μορίων πρόσδεσης, χημειοτακτικών παραγόντων όπως την χημειοτακτική πρωτεΐνη τύπου 1 των μονοκυττάρων (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) και αυξητικών παραγόντων όπως τον παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), με τελικό αποτέλεσμα την μετανάστευση των μονοκυττάρων εντός του αγγειακού τοιχώματος. Η οξειδωμένη LDL έχει και άλλες ιδιότητες, όπως την παρεμπόδιση της σύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO), ενός σημαντικού μεσολαβητή για την αγγειακή χάλαση (vasodilation) και την επαγωγή της έκφρασης των ενδοθηλιακών μορίων πρόσδεσης των λευκοκυττάρων (endothelial leukocyte adhesion molecules, ELAMs). Μεταξύ των βασικών μορίων πρόσδεσης, παραγόμενων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, για τη συνάθροιση των λευκοκυττάρων είναι ο ICAM-1, η P- και E-σελεκτίνη (P-, E-selectin), ο PCAM-1, και ο VCAM-1. Τα σπουδαιότερα μόρια πρόσδεσης παραγόμενα από τα μονοκύτταρα είναι, η β2-ιντεγκρίνη (b2 integrin), ο VLA-4 και ο PCAM-1. Προϊόντα γλυκοσυλίωσης (advanced glycosylation endproducts, AGEs) παράγονται στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, όπου προάγουν τη φλεγμονή διαμέσου ειδικών υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Στους μηχανισμούς στρατολόγησης μονοκυττάρων εμπλέκονται η P-selectin, η E-selectin, τοVCAM-1, το ICAM-1 και το JAM-A. Εμπλέκονται επίσης στην κυκλοφορία των μονοκυττάρων στην αορτή, οι χυμοκίνες CXCL1, CCL5, CXCL4, CXCL7 και MIF.

Τα Τ και Β λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν μέσα στο φυσιολογικό και αρτηριοσκληρωτικό αορτικό τοίχωμα με τρόπο εξαρτώμενο από την L-selectin. Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν ένα σημαντικό ρόλο των χυμοκινών CCL5, CXCL10, CXCL16, CXCR6 και MIF, στην εισροή λεμφοκυττάρων μέσα στο αρτηριοσκληρωτικό τοίχωμα (81).

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα φλεγμονώδη κύτταρα απαιτεί την παρουσία CD40 υποδοχέα στην επιφάνεια των μακροφάγων και του συνδέτη του CD40L στην επιφάνεια των Τ-λεμφοκυττάρων. Η αμοιβαία δράση αυτών των κυττάρων παράγει ανοσολογική απάντηση τύπου T-helper 1 (Th-cellular) ή τύπου 2 (Th- humoral). Η τρέχουσα πεποίθηση είναι ότι η Th1 τύπου ανοσολογική απάντηση και οι μεσολαβητές της: IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-12 και IL-18 επιταχύνουν την αρτηριοσκλήρωση, ενώ η απάντηση τύπου Th2 και οι μεσολαβητές της: IL-4, IL-5, IL-10, και IL-13 αναστέλλουν την ανάπτυξη της αρτηριοσκλήρωσης (82).

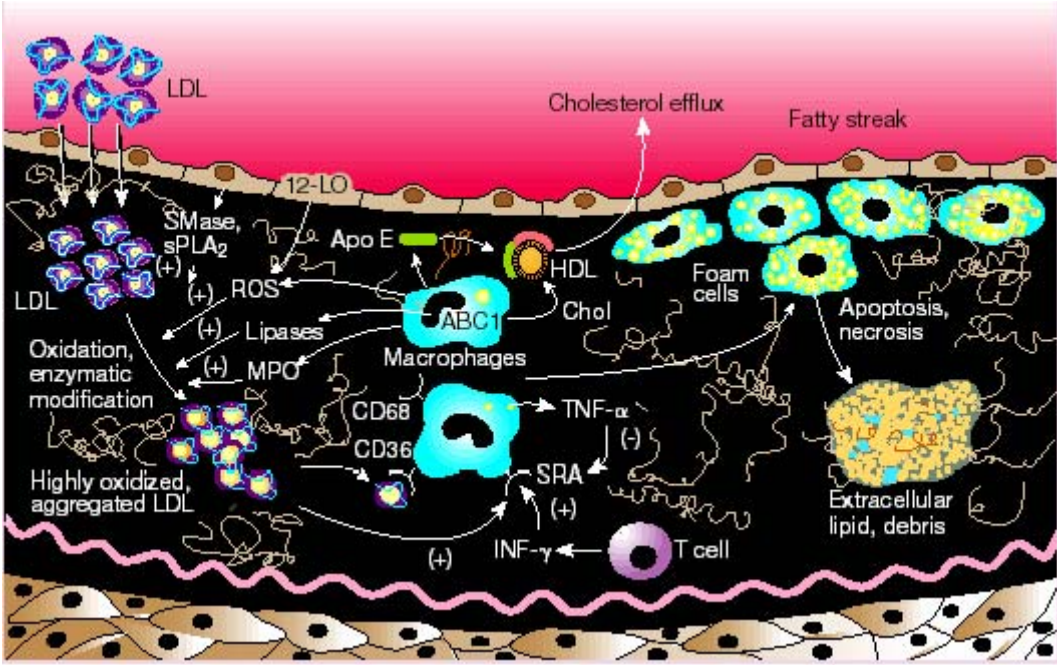
## 2.4 ΑΦΡΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα αφρώδη κύτταρα είναι το κύριο συστατικό των πρώιμων αθηρωματικών βλαβών, οι οποίες ονομάζονται λιπώδεις ράβδοι (fatty streaks). Οι λιπώδεις ράβδοι, στον άνθρωπο βρίσκονται στην αορτή στην πρώτη δεκαετία της ζωής του, στις στεφανιαίες αρτηρίες στη δεύτερη δεκαετία και στις εγκεφαλικές αρτηρίες στην τρίτη και τέταρτη δεκαετία (83).

Η γρήγορη πρόσληψη υψηλά οξειδωμένης (τροποποιημένης) LDL από μακροφάγα, που οδηγεί σε σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (foam cells), μεσολαβείται από μια ομάδα υποδοχέων που αναγνωρίζουν ευρύ φάσμα συνδετών. Δύο τέτοιοι υποδοχείς, «καθαριστές» (scavenger receptors) όπως λέγονται, ο SR-A και ο CD36, φαίνεται να είναι πρωταρχικής σημασίας, και ποντίκια που δεν έχουν έναν από τους δυο υποδοχείς έχουν λιγότερες αρτηριοσκληρωτικές βλάβες (84, 85).

Η έκφραση των scavenger receptors ρυθμίζεται από έναν μεταγραφικό παράγοντα, τον peroxisome proliferator-activated receptor-γ, του οποίου συνδέτες είναι τα οξειδωμένα λιπαρά οξέα και κυτοκίνες όπως ο TNF-a, και η ιντερφερόνη-γ (interferon-γ, IFN-γ) (86).

Με την πάροδο του χρόνου τα αφρώδη κύτταρα πεθαίνουν συνεισφέροντας το λιπιδικό τους περιεχόμενο στο νεκρωτικό πυρήνα της βλάβης.




**Εικόνα 8:** Δημιουργία αφρωδών κυττάρων (foam cells). Συσσωματώματα υψηλά οξειδωμένης LDL δημιουργούνται στο αγγειακό τοίχωμα μετά από τη δράση ενεργών οξυγονούχων μορίων (reactive oxygen species, ROS) και των ενζύμων σφιγγομυελινάσης (sphingomyelinase, SMase), εκκριτικής φωσφολιπάσης-2 (secretory phospholipase 2, sPLA2), άλλων λιπασών και της μυελοπεροξειδάσης (myeloperoxidase, MPO). Τα οξειδωμένα συσσωματώματα της LDL αναγνωρίζονται από τους scavenger υποδοχείς των μακροφάγων, όπως ο SR-1, ο CD36 και ο CD68T υποδοχέας. Η σύνθεση των scavenger receptors επάγεται από κυτταροκίνες όπως ο TNF-a και η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ). Τα αφρώδη κύτταρα εκκρίνουν απολιποπρωτεΐνη Ε (apolipoprotein E, apoE), με την οποία διευκολύνεται η απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από το κύτταρο. Ο θάνατος των αφρωδών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση λιπιδίων αλλά και άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων στον εξωκυττάριο χώρο.

## 2.5 ΑΠΩΤΕΡΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

Παθολογικές μελέτες έδειξαν ότι η δημιουργία θρόμβου, εξαρτάται αρχικά από τη σύσταση και την αστάθεια-τρωτότητα της αθηρωματικής πλάκας και λιγότερο από τη σοβαρότητα της στένωσης (Εικόνα 9). Γενικώς οι ασταθείς πλάκες παρουσιάζουν λεπτά ινώδη καλύμματα (fibrous caps) και αυξημένο αριθμό φλεγμονωδών κυττάρων. Η διατήρηση και η υποστήριξη του ινώδους καλύμματος, προϋποθέτει την παραγωγή και την αποικοδόμηση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, και τα παράγωγα των φλεγμονωδών κυττάρων πιθανόν να επηρεάζουν τη διεξαγωγή των δύο αυτών λειτουργιών.

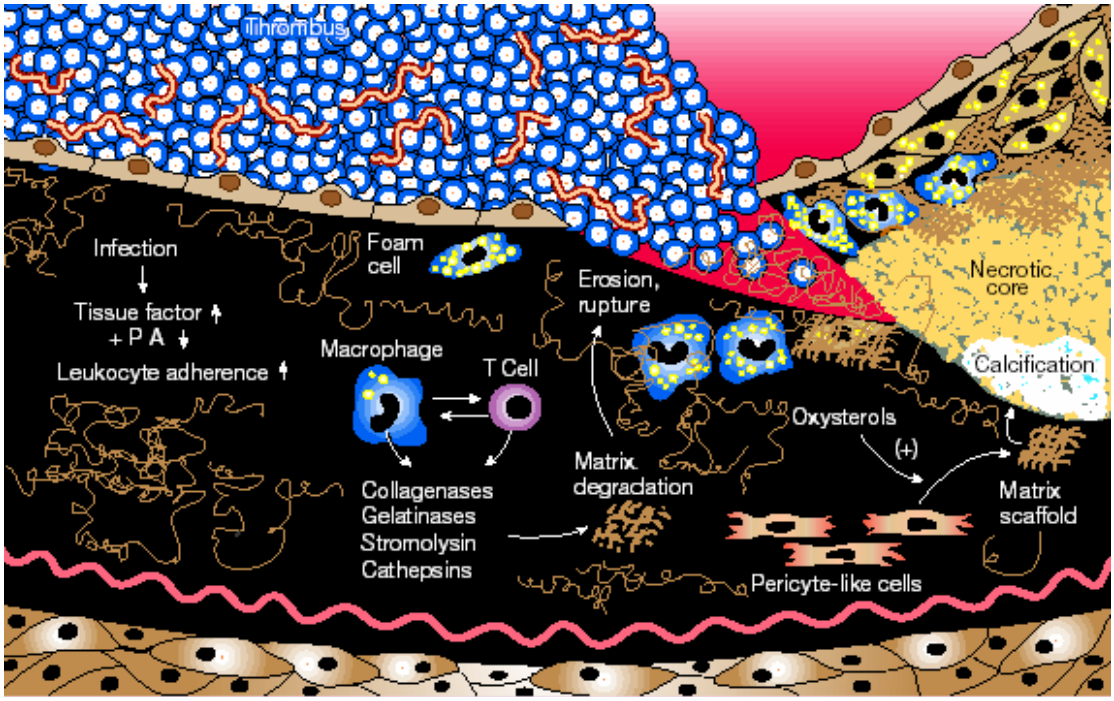
Για παράδειγμα, τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγουν IFN-γ, η οποία παρεμποδίζει την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας από τα SMCs, ενώ τα μακροφάγα παράγουν διάφορες πρωτεάσες, όπως διάμεση κολλαγενάση (collagenase), γελατινάσες

(gelatinases) και στρωμολυσίνη (stromolysin) (87), οι οποίες καταστρέφουν την εξωκυττάρια ουσία. Συχνά, η ρήξη εκδηλώνεται στις παρυφές των βλαβών όπου χαρακτηρίζονται από την πλούσια συνάθροιση αφρωδών κυττάρων, υποδεικνύοντας έτσι, ότι όλοι αυτοί οι αθηρογενετικοί παράγοντες εκτός του ότι στηρίζουν με την παρουσία τους μέσα στην αθηρωματική πλάκα τους μηχανισμούς φλεγμονής, συμβάλλουν και στη δημιουργία του θρόμβου. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, πρέπει να τονιστεί ότι η συχνότητα του εμφράγματος του μυοκαρδίου και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων αυξάνει κατά τη διάρκεια οξέων λοιμώξεων.

Η σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών θα μπορούσε επίσης να επηρεάζεται από την ασβεστοποίηση και τη νεοαγγειογένεση, δύο χαρακτηριστικά των επιπλεγμένων βλαβών. Η υπενδοθηλιακή ασβεστοποίηση είναι μία ενεργός διαδικασία στην οποία τα περιτριχοειδικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες, δημιουργώντας έτσι ένα εξωκυττάριο ικρίωμα. Στη συνέχεια επέρχεται η ασβεστοποίησή του, ένα φαινόμενο που μοιάζει με αυτό της οστεοποίησης. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται από oxysterols και κυτταροκίνες (88). Τα αγγεία μικρού μεγέθους που αναπτύσσονται στην περιοχή του μέσου χιτώνα (media), συμβάλλουν στη διεύρυνση της βλάβης, εμπλουτίζοντάς την με φλεγμονώδη κύτταρα από την περιφέρεια (89).

Η θρόμβωση στις περιοχές της βλάβης φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία του tissue factor, μιας πρωτεΐνης-κλειδί για την έναρξη της αντίδρασης «καταρράκτη» της πήξης. Η αύξηση της παραγωγής του tissue factor από τα ECs και τα μακροφάγα εξαρτάται από την oxLDL, από λοιμώξεις, ή από την πρόσδεση του CD40 των ECs με το συνδέτη του CD40L στα φλεγμονώδη κύτταρα (90). Υπάρχει μία σειρά άλλων μεσολαβητικών μορίων που θα μπορούσαν να είναι σημαντικά για τη δημιουργία του θρόμβου, όπως ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (plasminogen activator).

Ορισμένοι βασικοί τρόποι διάσπασης της πλάκας προκαλούν τους περισσότερους θρόμβους των στεφανιαίων . Ο πρώτος μηχανισμός, ο οποίος ευθύνεται για τα δύο τρίτα των οξέων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου εμπεριέχει ρήξη του ινώδους καλύμματος της πλάκας. Ένας άλλος μηχανισμός περιλαμβάνει την επιπολής διάβρωση του έσω χιτώνα, και ευθύνεται για το ένα τέταρτο των οξέων εμφραγμάτων μυοκαρδίου σε ασθενείς που είχαν αιφνίδιο θάνατο (93).




**Εικόνα 9:** Προχωρημένες βλάβες και θρόμβωση. Η ευαίσθητη πλάκα με ένα λεπτό ινώδες κάλυμμα είναι το αποτέλεσμα της αποικοδόμησης του συνδετικού ιστού από πρωτεϊνάσες, όπως κολλαγενάσες (collagenases), γελατινάσες (gelatinases) και στρωμολυσίνη (stromolysin) καθώς επίσης και της παρεμπόδισης της σύνθεσης και έκκρισης των δομικών στοιχείων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Μεταξύ των παραγόντων που προκαλούν την αστάθεια της πλάκας και επάγουν τη θρόμβωση είναι η λοίμωξη, η οποία μπορεί να δρα συστηματικά επάγοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης ή δρώντας τοπικά επάγοντας την έκφραση του tissue factor και καταστέλλοντας την έκφραση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (plasminogen activator, PA). Η ασβεστοποίηση της πλάκας είναι μία ενεργός διαδικασία στην οποία τα περιτριχοειδικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες, δημιουργώντας έτσι ένα εξωκυττάριο ικρίωμα. Στη συνέχεια επέρχεται η ασβεστοποίησή του, ένα φαινόμενο που μοιάζει με αυτό της οστεοποίησης. Η δημιουργία θρόμβου, είναι συνέπεια πρόσδεσης αιμοπεταλίων και ινώδους, η οποία είναι συνήθως το αποτέλεσμα της αποκόλλησης της πλάκας.

Στην αρχή η βλάβη επεκτείνεται προς τον έξω χιτώνα των αρτηριών (adventitia), μέχρι ενός κρίσιμου σημείου μετά το οποίο αναπτύσσεται προς τον αυλό προκαλώντας τη στένωσή του (83).

Η πλάκα μπορεί να ραγεί οπότε δημιουργείται θρόμβος, ο οποίος αποφράζει τον αυλό της αρτηρίας. Αυτή η οξεία απόφραξη είναι η συνηθέστερη αιτία οξέος εμφράγματος και σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες μόνο το 15% των οξέων εμφραγμάτων προέρχονται από βλάβες που είχαν βαθμό στενώσεως πάνω από 60% σε προηγούμενες στεφανιαιογραφίες(94, 95).

Οι διεργασίες της αρτηριοσκλήρυνσης διαρκούν αρκετές δεκαετίες και η εξέλιξη της στένωσης είναι διακοπτόμενη από περιόδους με πολύ μικρή αύξηση, όπως προκύπτει από αγγειογραφικά δεδομένα. Απόφραξη μεγαλύτερη του 60% του αυλού μπορεί να

προκαλέσει ελάττωση της ροής του αίματος σε συνθήκες αυξημένων αναγκών και, κατά συνέπεια, χρόνια σταθερή στηθάγχη ή διαλείπουσα χωλότητα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ

Τα αίτια της αρτηριοσκλήρυνσης και της στεφανιαίας νόσου είναι γενετικά και περιβαλλοντικά: (83)

Γενετικά

1. Αυξημένα επίπεδα LDL /VLDL: Κλινικές μελέτες υποστηρίζουν κέρδος από ελάττωση της χοληστερόλης.
2. Ελαττωμένα επίπεδα HDL
3. Αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης( a): Συσχέτιση παρατηρείται σε πολλές αλλά όχι σε όλες τις επιδημιολογικές μελέτες. Οι μελέτες σε ζώα είναι αντιφατικές.
4. Αυξημένη πίεση αίματος: Κλινικές μελέτες έχουν δείξει οφέλη από ελάττωση της αρτηριακής πίεσης με ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα στο έμφραγμα. Η υπέρταση χαρακτηρίζεται από αυξημένη συγκέντρωση της αγγειοτασίνης ΙΙ, που συμβάλλει στην αθηρογένεση διεγείροντας τη σύσπαση και την υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων, από δραστηριότητα της λιποοξυγενάσης στα λεία μυικά κύτταρα, η οποία αυξάνει την οξείδωση της LDL. Επίσης η υπέρταση δρα αθηρογενετικά ελαττώνοντας το σχηματισμό NO, αυξάνοντας την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και αυξάνοντας τις περιφερικές αντιστάσεις (72).
5. Αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης: Η αύξηση της συγκέντρωσης της ομοκυστεΐνης πλάσματος συσχετίζεται με προχωρημένη αρτηριοσκλήρυνση σε ασθενείς ομοζυγώτες στη βλάβη ενζύμων απαραίτητων για το μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης, όπως η βήτα συνθάση της κυσταθειονίνης ή η αναγωγάση του μεθυλενοτετραϋδροφολικού. Σε ασθενείς με τέτοιες βλάβες αναπτύσσεται σοβαρή αρτηριοσκλήρυνση από την παιδική ηλικία και έχουν το πρώτο τους έμφραγμα του μυοκαρδίου από την ηλικία των 20 ετών.

Η ομοκυστεΐνη είναι τοξική για το ενδοθήλιο, αυξάνει την παραγωγή κολλαγόνου, ελαττώνει τη διαθεσιμότητα NO, και είναι προθρομβωτική.

Σε πολλούς ασθενείς χωρίς ενζυμικές βλάβες στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης, η συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης είναι ελαφρά αυξημένη. Αυτοί οι ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο συστηματικής αρτηριοσκλήρυνσης των στεφανιαίων,

εγκεφαλικών και περιφερικών αρτηριών. Η θεραπεία με φυλλικό οξύ μπορεί νε επαναφέρει τη συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης σε φυσιολογικά επίπεδα.

6. Οικογενειακό ιστορικό: Όταν όλοι οι γνωστοί παράγοντες κινδύνου είναι υπό έλεγχο, το οικογενειακό ιστορικό παραμένει ένας αξιοσημείωτος ανεξάρτητος παράγων.

7. Διαβήτης: Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end-products, AGEs) δημιουργούνται στον σακχαρώδη διαβήτη, ως αποτέλεσμα χρόνιας υπεργλυκαιμίας και αυξημένου οξειδωτικού στρες. Τα AGEs μέσω ευθείας ή εξαρτώμενης από υποδοχέα οδού, προάγουν την ανάπτυξη και την πρόοδο της καρδιαγγειακής νόσου. Τα AGEs συσσωρεύονται σε πολλές περιοχές του σώματος, στην καρδιά και στα μεγάλα αγγεία, στον διαβήτη. Αυτές οι τροποποιημένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με υποδοχείς όπως ο RAGE, για να εισάγουν οξειδωτικό στρες, να αυξήσουν την φλεγμονή μέσω προαγωγής της ενεργοποίησης του NFkappaB και να επαυξήσουν τη συσσώρευση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Αυτές οι βιολογικές επιδράσεις προκαλούν επιτάχυνση του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών στο διαβήτη καθώς και αυξημένη καρδιακή ίνωση, με επακόλουθα στην καρδιακή λειτουργία. Στρατηγικές ελάττωσης της σύνδεσης των AGEs στους υποδοχείς τους όπως παράγοντες που ελαττώνουν τη συσσώρευση AGEs, διαλυτό RAGE που δρα ως ανταγωνιστής στη σύνδεση AGEs με RAGE και γενετικές απαλείψεις του RAGE μετριάζουν την αρτηριοσκλήρωση που εξαρτάται από τον σακχαρώδη διαβήτη(78).

8.Αυξημένα επίπεδα αιμοστατικών παραγόντων: Αξιοσημείωτες ανεξάρτητες συσχετίσεις έχουν παρατηρηθεί με αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου και αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 1(PAI-1) και αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων.

9.Κατάθλιψη και άλλα γνωρίσματα συμπεριφοράς: Συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν σε διάφορες μελέτες πληθυσμών.

10. Φύλο (άνδρες): Κάτω από 60 ετών οι άνδρες αναπτύσσουν χρόνια καρδιακή νόσο δύο φορές συχνότερα από τις γυναίκες. Τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία από αρτηριοσκλήρυνση καθώς ελαττώνουν τα επίπεδα λιποπρωτεϊνών πλάσματος, εισάγουν την προστακυκλίνη και αυξάνουν το NO.

11. Συστηματική φλεγμονή: Αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών μορίων όπως η C αντιδρώσα πρωτεΐνη συσχετίζεται με χρόνια καρδιακή νόσο, όπως και φλεγμονώδεις ασθένειες, σαν την ρευματοειδή αρθρίτιδα.

12. Μεταβολικό σύνδρομο: Ισχυρή συσχέτιση με χρόνια καρδιακή νόσο. Ειδικά για το μεταβολικό σύνδρομο, αξίζει να γίνει αναφορά στο σύγχρονο ορισμό του, που απαιτεί τρία από τα παρακάτω πέντε κριτήρια: περίμετρος μέσης μεγαλύτερη από 102cm στους άνδρες και 88cm στις γυναίκες, επίπεδα τριγλυκεριδίων τουλάχιστον 150mg/dl, HDL χοληστερόλη λιγότερη από 40mg/dl στους άνδρες και 50mg/dl στις γυναίκες, αρτηριακή πίεση τουλάχιστον 130/85mm Hg και τέλος γλυκόζη αίματος τουλάχιστον 110mg/dl. Με βάση τις παραμέτρους αυτές, ο επιπολασμός του μεταβολικού συνδρόμου στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής είναι εικοσιπέντε τοις εκατό ή περίπου πενήντα εκατομμύρια άνθρωποι.

13. Παχυσαρκία: Μελέτες της τελευταίας δεκαετίας δείχνουν ότι ο λιπώδης ιστός δεν είναι μόνο μια περιοχή αποθήκευσης τριγλυκεριδίων αλλά και ένα ενεργό ενδοκρινικό όργανο που εκκρίνει πολλούς βιολογικά ενεργούς μεσολαβητές που αναφέρονται ως “adipokines”. Σε αντίθεση με πολλές adipokines που υπερπαράγονται σε παχύσαρκα άτομα και έχουν δηλητηριώδεις επιδράσεις στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και στο καρδιαγγειακό σύστημα, όπως η λεπτίνη, ο TNF-a, ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (PAI-1) η resistin, κ.ά, η adiponectin μοιάζει να είναι μια μοναδική adipokine που παράγεται σε χαμηλότερα ποσά στους παχύσαρκους από ότι στους αδύνατους, και έχει κυρίως ωφέλιμες δράσεις π.χ αυξάνει την υπερευαισθησία στην ινσουλίνη, αποτρέπει την φλεγμονώδη αντίδραση και προκαλεί, μέσω NO, αγγειοδιαστολή. Η adiponectin συνδέεται με δύο υποδοχείς, τον AdipoR1 και τον AdipoR2. Ποντίκια Adiponectin knockout παρουσιάζουν ποικίλες εκδηλώσεις του μεταβολικού συνδρόμου όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, η έλλειψη ανοχής στη γλυκόζη, η υπερλιπιδαιμία, η βλάβη της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής και η υπέρταση και ο αυξημένος σχηματισμός intima μετά από αγγειακή βλάβη. Κλινικές μελέτες δείχνουν ότι η συγκέντρωση adiponectin στο πλάσμα είναι χαμηλότερη σε ασθενείς με υπέρταση και ισχαιμική καρδιακή νόσο. Η αύξηση του επιπέδου της ενδογενούς adiponectin και η αύξηση της ευαισθησίας σ’ αυτήν την ορμόνη μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική για ασθενείς με μεταβολικές και καρδιαγγειακές νόσους. Ανάμεσα στα τρέχοντα χρησιμοποιούμενα φάρμακα, οι θειαζολιδόνες (αγωνιστές του peroxisome proliferator activated receptor gamma) είναι τα πιο αποτελεσματικά στην αύξηση των επιπέδων της adiponectin (96).

Περιβαλλοντικά

1. Διατροφή πλούσια σε λίπη: Μελέτες πληθυσμού μεταναστών και επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ισχυρές συσχετίσεις με τον τρόπο ζωής και η δίαιτα φαίνεται να είναι ο πιο αξιοσημείωτος παράγων. Δίαιτες πλούσιες σε λίπος και χοληστερόλη συνήθως απαιτούνται για την ανάπτυξη αρτηριοσκλήρωσης πειραματικά σε ζώα.
2. Κάπνισμα: Ισχυρές συσχετίσεις παρατηρούνται σε πολλές επιδημιολογικές μελέτες. Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει το κέρδος της διακοπής καπνίσματος. Το κάπνισμα προκαλεί παραγωγή υπεροξειδικών ανιόντων, ελαττώνει την παραγωγή και τη βιοδιαθεσιμότητα του νιτρικού οξειδίου (NO) και αυξάνει την παραγωγή και την απελευθέρωση ενδοθηλίνης και προκαλεί θρόμβωση (97).
3. Χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών: Αποτελέσματα κλινικών δοκιμών με αντιοξειδωτικά δεν είναι αδιαμφισβήτητα. Λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά προστατεύουν κατά της αρτηριοσκλήρυνσης, πειραματικά, ζώα εντούτοις.
4. Έλλειψη άσκησης: Σημαντική ανεξάρτητη συσχέτιση με χρόνια καρδιακή νόσο. Η άσκηση ελαττώνει την νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακή νόσο. Σε μοριακό επίπεδο συσσωρευμένες ενδείξεις υποδηλώνουν ότι κανονική φυσική δραστηριότητα επανορθώνει την ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή NO και την απενεργοποίησή του από ROS. Επιπλέον, η άσκηση πιθανόν να αποκαθιστά την αναγεννητική ικανότητα των κυκλοφορόντων προγονικών κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών και μετατρέπονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα αποκαθιστώντας βλάβες του ενδοθηλίου (98).
5. Φλεγμονώδεις παράγοντες: Επιδημιολογικές μελέτες υποδηλώνουν συσχέτιση με ποικίλους λοιμώδεις παράγοντες, όπως Chlamydia pneumoniae. Προκαταρτικές μελέτες σε ζώα υποστηρίζουν τη συσχέτιση.

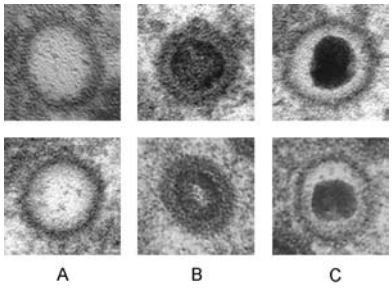
Σε διάφορες μελέτες έχει εκτιμηθεί η πιθανή ανάμιξη του αδενοϊού, του HSV, του ιού Epstein Barr, των εντεροϊών και του helicobacter pylori στην γένεση της αρτηριοσκλήρυνσης. Εντούτοις το Chlamydia pneumoniae και ο κυτταρομεγαλοϊός (cytomegalovirus, CMV) είναι τα πιο συχνά ενοχοποιούμενα παθογόνα (99-104).

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.**

## ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ CMV

Ο CMV ανήκει στην υποοικογένεια *beta-herpesvirinae* της οικογένειας *Herpesviridae.* Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η πλειονότητα των ανθρώπων έχει ήδη υποστεί λοίμωξη από CMV κατά την πρώιμη ενήλικη ζωή τους, ενώ στις ανεπτυγμένες χώρες περισσότερο από 70% των ανθρώπων έχουν υποστεί λοίμωξη έως την ηλικία των 65 ετών.

Ο ιός εισέρχεται στα κύτταρα με άμεση συγχώνευση (direct fusion) και πολλαπλασιάζεται στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου. Το γονιδίωμά του αποτελείται από DNA διπλής έλικας, ένα εικοσαεδρικό καψίδιο αποτελούμενο από 162 καψομερίδια, ένα καλυπτήριο σύστημα (tegument) και ένα φάκελο (envelope).




**Εικόνα 10:** Πυρηνοκαψίδια ερπητοϊών σε καθορισμένα στάδια ωρίμανσης. Α) Άδεια νουκλεοκαψίδια Β) Νουκλεοκαψίδια με στίλβοντα πυρήνα Γ) Νουκλεοκαψίδια που περιέχουν DNA.

*Τρόποι μετάδοσης του CMV*

Ο CMV μεταδίδεται από την έγκυο γυναίκα στο έμβρυο, με το θηλασμό, με το σάλιο, με τη σεξουαλική επαφή, με το αίμα και τα παράγωγά του, και με τη μεταμόσχευση οργάνων(105) .

*Κλινική εικόνα λοίμωξης από CMV*

Ο ιός προκαλεί αφανείς (latent) λοιμώξεις και περιοδικά επανενεργοποιείται.

Στην πλειονότητα των ανοσοεπαρκών ατόμων η λοίμωξη από ιό CMV είναι ασυμπτωματική, εκτός από περιστασιακές περιπτώσεις ανάπτυξης συνδρόμου λοιμώδους μονοπυρηνώσεως. Όπου υπάρχουν συμπτώματα αυτά είναι ήπια, όπως, χαμηλός πυρετός, μεγάλης διάρκειας -κατά μέσο όρο 19 ημέρες-, λεμφαδενοπάθεια, φαρυγγίτιδα, σπληνομεγαλία, μερικές φορές ηπατική συμμετοχή. Η εικόνα αυτή που ονομάζεται και σύνδρομο λοιμώδους μονοπυρηνώσεως αποδράμει χωρίς θεραπεία. Έχει περιγραφεί ανάπτυξη συνδρόμου Guillain Barre σε πρωτογενή λοίμωξη από CMV. Εργαστηριακά ανευρίσκεται άτυπη λεμφοκυττάρωση και αύξηση των τρανσαμινασών. Αντίθετα σε ανοσοανεπαρκή άτομα ο ιός προκαλεί:

εξέλκωση του εντέρου, ηπατίτιδα, αμφιβληστροειδίτιδα, πνευμονίτιδα, μυοκαρδίτιδα, καταστολή του μυελού των οστών, εγκεφαλοπάθεια ή/και νόσο του Addison (106).

## 4.1 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ IN VITRO ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΟΝ ΡΟΛΟ ΤΟΥ CMV ΣΤΗΝ ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

Παρατηρήσεις in vitro υποστηρίζουν ένα πιθανό αιτιολογικό ρόλο του CMV στην αρτηριοσκλήρυνση. Η μελέτη του Westphal M. διεξήχθη σε τμήματα αορτής ασθενών που υποβλήθηκαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη κι εξετάστηκε η έκφραση των μορίων πρόσφυσης μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, και η έκφραση των αυξητικών παραγόντων PDGF-AA και TGF-β με ανοσοϊστοχημεία, καθώς και η παρουσία CMV DNA με PCR. Σε CMV (+) ασθενείς η έκφραση των μορίων προσκόλλησης ήταν αυξημένη. Η υπερλιπιδαιμία ήταν ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για CMV(+) (107).

Ο CMV κωδικοποιεί τον υποδοχέα χημειοκίνης, US28 που συνδέεται με πολλές χημειοκίνες και μεσολαβεί στην in vitro μετανάστευση SMCs (108).

Διεγείρει τη συσσώρευση mRNA και έκφραση στην επιφάνεια των μονοκυττάρων/μακροφάγων, scavenger receptor CD36, που αυξάνει την πρόσληψη oxLDL(109).

Η μόλυνση λείων μυϊκών κυττάρων με CMV απενεργοποιεί την p53, που η λειτουργία της είναι να σταματά τον κυτταρικό κύκλο και να προκαλεί απόπτωση (110, 111).

Επίσης βρέθηκε ότι τα πρόσφατα απομονωμένα ανθρώπινα μονοκύτταρα τα οποία είναι μολυσμένα με CMV που έχει περάσει από ενδοθήλιο, ήταν ικανά να μεταφέρουν τον ιό σε συγκαλλιεργούμενα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα (112).

Λεία μυϊκά κύτταρα στεφανιαίων αρτηριών, μολυσμένα με CMV, παρουσίαζαν γρήγορη αύξηση των ROS και ενεργοποίηση γονιδίων που συμμετείχαν στην ιική αντιγραφή και στη φλεγμονή. Η οιστραδιόλη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις εμπόδιζε τη γένεση των ROS, στα μολυσμένα με CMV, VSMCs. Επίσης εμπόδιζε τη σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα, για σύνθεση IL1,2,6,8, ICAM-1 και VCAM-1, NFkappaB στο DNA, και την αντιγραφή του ιού (113).

Πειράματα σε ζώα με CMV επίσης δεν αντιγράφουν την νόσο του ανθρώπου αλλά μπορούν να παρέχουν ιδέες για την αιτιοπαθογένεια. Ενώ η λοίμωξη από CMV στα ποντίκια, αρκετούς μήνες πριν ή κατά τη διάρκεια βλάβης από μπαλόνι, στην

καρωτίδα, προκαλούσε πάχυνση του έσω χιτώνα, η λοίμωξη 14 μέρες μετά τη βλάβη δεν είχε τέτοιο αποτέλεσμα(114, 115). Σε ποντίκια με έλλειψη Apo-E, η συστηματική φλεγμονή αύξανε το μέγεθος της βλάβης(114). Η τοπική λοίμωξη από CMV επέτεινε την υπενδοθηλιακή φλεγμονή και τη στεφανιαία αρτηριοσκλήρυνση σε καρδιακά και αορτικά αλλομοσχεύματα, ενώ η αγωγή με ganciclovir την ελάττωνε, εμφανώς.

# ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Προηγούμενες μελέτες έχουν εκτιμήσει το ρόλο το ρόλο του CMV στην αρτηριοσκλήρυνση, αλλά τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Στην παρούσα μελέτη εκτιμήσαμε την ενδεχόμενη εμπλοκή του CMV στην αθηρογένεση με σύγκριση της συχνότητας ανίχνευσης ιικού DNA στις αρτηριοσκληρυντικές βλάβες και σε φυσιολογικά αγγεία.

# Β΄ ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## ΜΕΘΟΔΟΙ

## 5.1 Εκχύλιση DNA ιστών

Αρχικά τα ιστικά δείγματα επωάζονται σε $55^o$-$60^oC$ με διάλυμα πρωτεϊνάσης K (20mg/ml). Μετά γίνεται προσθήκη 200λ φαινόλης και 200λ χλωροφόρμιου, φυγοκέντρηση (5min, 13000στροφές/min, RT). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια όπου μετά την προσθήκη 400λ χλωροφόρμιου, με ανάδευση ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση (5min, 13000στροφές/min, RT). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια και προστίθεται αιθανόλη 100% (-$20^o$ C). Προστίθεται 20λ NaCl 5M. Με ανάδευση και φύλαξη στους (-$20^o$ C) για 24 h πραγματοποιείται η κατακρήμνιση του DNA. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση (15 min, 13000 στροφές/min, $4^oC$). Μετά την απόρριψη της αιθανόλης 100%, προστίθεται αιθανόλη 70% 1000λ, φυγοκέντρηση (5min, 13000 στροφές/min, $4^oC$), απόρριψη της αιθανόλης και προσθήκη 100λ $H_2O$ και αποθήκευση σε $4^oC$ και ακολούθως σε -$20^oC$.

## 5.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας DNA

Καθορίστηκαν με υπεριώδες φασματοφωτόμετρο (Hitatchi Instruments Inc., USA) Η συγκέντρωση καθορίστηκε με βάση την απορρόφηση στα 260nm και η καθαρότητα με βάση τον λόγο της απορρόφησης στα 260nm προς τα 280nm. Η συγκέντρωση δίκλωνου DNA προσδιορίζεται από τον τύπο $C_{DNA} = A_{260}$ * τίτλος *50(για δίκλωνο DNA)/1000. Κατόπιν τα δείγματα αραιώθηκαν ώστε η συγκέντρωση DNA να είναι 100ng/μl που είναι ιδανική για PCR.

## 5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση

Ανακαλύφθηκε το 1985 από τον Kary Mullis και τους συνεργάτες του που γι' αυτό το λόγο βραβεύθηκε με Nobel Χημείας το 1993 (116).

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (polymerase chain reaction, PCR) είναι μια εργαστηριακή τεχνική εκλεκτικής παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που βασίζεται στην επιμήκυνση ενός εκκινητή με πρότυπο τις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA. Εκκινητές (primers) είναι αλληλουχίες DNA μέσω των οποίων η DNA πολυμεράση κατευθύνεται σε

συγκεκριμένη περιοχή του μητρικού DNA και ξεκινά τον πολυμερισμό από το 3΄άκρο του εκκινητή(117). Οι DNA πολυμεράσες συνθέτουν μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA με κατεύθυνση 5΄προς 3΄ χρησιμοποιώντας ένα μονής αλυσίδας υπόστρωμα, αλλά ξεκινώντας από μια διπλή αλυσίδα. Χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές, καθένας συμπληρωματικός σε αντίθετες αλυσίδες περιοχής του DNA, που έχουν αποχωριστεί με θέρμανση. Οι εκκινητές είναι τακτοποιημένοι έτσι ώστε η αντίδραση επιμήκυνσης να κατευθύνει τη σύνθεση του DNA προς το μέρος του άλλου εκκινητή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση της περιοχής του DNA που πλαισιώνεται από τους δύο εκκινητές. (118)

Τα βασικά συστατικά μιας αντίδρασης PCR είναι: το υπόστρωμα DNA, η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, τα dNTPs, οι εκκινητές καθώς και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει Mg++. Αυτά αναμιγνύονται, επικαλύπτονται με παραφινέλαιο για να αποφευχθεί εξάτμιση του ύδατος, τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή και θερμαίνονται στους 93-100$^{o}$C για 3-5min ώστε να αποδιαταχθεί το DNA και ακολουθούν οι κύκλοι της αντίδρασης (25-35 κύκλοι) που αποτελούνται από μια φάση αποδιάταξης του DNA στους 94-95$^{o}$C, φάση υβριδισμού των εκκινητών, στους 55-60$^{o}$C, και φάση πολυμερισμού των dNTPs, στους 72$^{o}$C. Η διάρκεια κάθε φάσης είναι 30-50 sec. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εκθετική αύξηση του αριθμού αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση $N= n (1+e)^{c}$

Όπου N η τελική ποσότητα του προϊόντος, n η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e η απόδοση της αντίδρασης και c ο αριθμός των κύκλων της PCR αντίδρασης.

Τα dNTPs και οι εκκινητές πρέπει να βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια, ώστε να είναι δυνατή η επανάληψη των τριών σταδίων της αντίδρασης (αποδιάταξη, πρόσδεση και πολυμερισμός) για αρκετούς κύκλους.

Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ανίχνευση αλληλουχιών ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο ποσό αντιγράφων.

Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. Στατιστικά έχει βρεθεί ότι όταν μια αλληλουχία DNA έχει μήκος 20bp τότε αυτή είναι μοναδική στο γονιδίωμα. Κατά συνέπεια, για να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση αλληλουχιών πρέπει οι εκκινητές να είναι 20-μερή. Πράγματι, αυτό είναι και το μέσο μήκος των εκκινητών, στην

συντριπτική πλειοψηφία των εφαρμογών, που τους δίνει μια τέτοια θερμοδυναμική σταθερότητα ώστε σε θερμοκρασία 55$^{o}$C να υβριδίζονται.

Η επίτευξη ικανοποιητικής αντίδρασης πολυμερισμού τόσο ως προς την απόδοση, όσο και ως προς την ειδικότητα, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τους εξής παράγοντες:

1. την επιλογή κατάλληλων εκκινητών
2. τη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας για τη δράση της πολυμεράσης
3. τον προσδιορισμό της ακριβούς θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών

Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών συνήθως η κανονικοποίηση των συνθηκών σε μία αντίδραση PCR, περιλαμβάνει πειράματα όπου σταδιακά μεταβάλλονται ανεξάρτητα μεταξύ τους η θερμοκρασία αναδιάταξης και η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου.

Οι εφαρμογές της PCR στην Ιατρική είναι: η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών (ιών, βακτηρίων, μυκήτων, παρασίτων) σε ασθενείς και φορείς και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις μικροοργανισμών που δεν μπορούν να αναπτυχθούν in vitro ή αναπτύσσονται με πολύ αργούς ρυθμούς και η καλλιέργειά τους είναι πολύ χρονοβόρα. Η εκτίμηση των ϊκών φορτίων με ποσοτική PCR μπορεί να καθορίσει την απόφαση για εφαρμογή θεραπείας και να χρησιμεύσει για παρακολούθηση της πορείας της νόσου σε ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπεία.

Η διάγνωση γενετικών ανωμαλιών με PCR βασίζεται στην ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδιακών αλλοιώσεων, όπως γονιδιακών ελλείψεων, ανακατατάξεων, σημειακών μεταλλάξεων και αλλαγών στο πλαίσιο ανάγνωσης, που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο κλινικό φαινότυπο. Παραδείγματα είναι η μυϊκή δυστροφία του Duchenne (με ελλείψεις εξονίων του γονιδίου της δυστροφίνης, στο χρωμόσωμα Χ) (119). Ο παράγωνV Leiden, συχνός κληρονομικός παράγοντας που προκαλεί υπερπηκτικότητα, χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση της αργινίνης από γλουταμίνη στη θέση 506 του παράγοντα V της πήξης (120). Η κυστική ίνωση από συγκεκριμένες ελλείψεις αμινοξέων όπως η ΔF508 στο χρωμόσωμα 7q όπου εντοπίζεται το γονίδιο CTFR.

Περισσότεροι από 50 τύποι κληρονομικών καρκίνων είναι γνωστοί όπως η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση με αλλαγές στο γονίδιο APC, ο καρκίνος του μαστού με μεταλλαγμένο τύπο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου BRCA1 που ευρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q21 και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου BRCA2

που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13q12-13. Επίσης ο καρκίνος του προστάτη με το γονίδιο HPC1 στο χρωμόσωμα 1q και άλλοι (121) .

Η ικανότητα ενίσχυσης γονιδιακών αλληλουχιών που προέρχονται ακόμη και από ένα μόνο κύτταρο κατέστησε δυνατή τη διάγνωση γενετικών ασθενειών σε έμβρυα, ακόμη και σε περιπτώσεις τεχνητής γονιμοποίησης, πριν την εμφύτευση στη μήτρα της γυναίκας. Ο προγεννητικός έλεγχος στις κανονικές κυήσεις μπορεί να γίνει είτε με λήψη αμνιακού υγρού στο οποίο υπάρχουν κύτταρα του εμβρύου, είτε από δείγμα χοριακής λάχνης. Στην περίπτωση της τεχνητής γονιμοποίησης, μπορεί να αφαιρεθεί από το έμβρυο ένα βλαστομερίδιο στο στάδιο των 6 έως 8 κυττάρων και να ανιχνευθούν οι υψηλά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος. Το έμβρυο μπορεί στη συνέχεια να μεταφερθεί στην μήτρα της γυναίκας και αναπτυχθεί χωρίς επιπτώσεις. Η εύρεση του φύλου κατ' αυτό τον τρόπο είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση των κληρονομικών φυλοσύνδετων ασθενειών (122).

Επίσης, με την χρήση της PCR είναι δυνατή η ανίχνευση γενετικού πολυμορφισμού ορισμένων γονιδίων, όπως των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας του ανθρώπου HLA τάξης II. Η εύρεση πολυμορφισμού των HLA είναι ιδιαίτερα σημαντική στις ακόλουθες περιπτώσεις: I. Στην περίπτωση μεταμόσχευσης για την εύρεση συμβατότητας μεταξύ του δότη και του δέκτη, ώστε να αποφευχθεί η απόρριψη. II. Στην αναγνώριση προσώπων για την Ιατροδικαστική. III. Στον έλεγχο πατρότητας, ως σύστημα εύρεσης δεικτών. Στην εύρεση προδιάθεσης σε διάφορες αυτοάνοσες νόσους, οπότε παρέχει τη δυνατότητα έγκαιρης θεραπείας. Στον έλεγχο εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών.

## 5.4 Ανίχνευση του CMV

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία πολλαπλασιάσιμου DNA χρησιμοποιώντας *beta-2 microglobulin* ως γονίδιο αναφοράς. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία ενός τμήματος του γονιδίου immediate early region του CMV χρησιμοποιώντας τους εκκινητές:

Forward: 5΄-GTGACCAAGGCCACGACGTT-3΄

Reverse: 5΄-TCTGCCAGGACATCTTTCTC-3΄

Το μείγμα της αντίδρασης σε όλες τις PCR για τον CMV αποτελούνταν από: PCR buffer 1X, 0.5 mM MgCl, 0.05mM κάθε dNTP, 0.3mM κάθε primer και 0.65U Taq polymerase.

Οι συνθήκες κυκλοποίησης για το CMV αποτελούνταν από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 94$^{o}$ C για 3 min, μετά 10 κύκλους από 94$^{o}$C για 50 sec, 60$^{o}$C για 40sec και 72$^{o}$C για 40 sec και 25 κύκλους από 94$^{o}$C για 50 sec, 58$^{o}$C για 40 sec και 72$^{o}$C για 40 sec και ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72$^{o}$C για 10 min.

Τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις της αντίδρασης PCR διεξήχθηκαν για κάθε δείγμα και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων ήταν υψηλή.

Τα προϊόντα έγιναν ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με βρωμιούχο εθίδιο το οποίο συνδέεται με τα νουκλεϊκά οξέα και, με την πρόσπτωση υπεριώδους ακτινοβολίας, φθορίζει. Τα δείγματα DNA επαναιωρούνταν σε χρωστική φόρτωσης που περιείχε 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 25% φυκόλη.

Το αναμενόμενο προϊόν είχε μήκος 354 bp.

## 5.5 Στατιστική ανάλυση

Το Fischer's exact test εφαρμόστηκε για να εκτιμηθεί η συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία ιικού DNA και την αρτηριοσκλήρυνση. Για να εκτιμηθεί το ανεξάρτητο αποτέλεσμα του CMV στην αρτηριοσκλήρυνση, περιλήφθηκε η παρουσία του CMV και των συνηθισμένων παραγόντων κινδύνου για στεφανιαία νόσο, σε μια πολλαπλή αναδρομική λογιστική ανάλυση. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι τιμές του $p$ κάτω από 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Η ανάλυση εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο Sigma Stat 10 (SPSS Inc., IL, USA).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.

## ΑΣΘΕΝΕΙΣ- ΥΛΙΚΑ

### 6.1 Ασθενείς

Ο πληθυσμός που μελετήθηκε αποτελούνταν από 21 άρρενες και 5 θήλεις ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο, μέσης ηλικίας 66 ετών (εύρους ηλικιών από 43έως78). Όλοι οι ασθενείς υφίσταντο αορτοστεφανιαία παράκαμψη στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Κρήτης μεταξύ Φεβρουαρίου 2005 και Μαίου 2005. Το πρωτόκολλο της μελέτης είχε την έγκριση της Επιτροπής Βιοηθικής του ιδρύματος.

Γραπτή συγκατάθεση εξασφαλίστηκε από όλους όσους έλαβαν μέρος στη μελέτη.

Δείγματα ελήφθησαν από 39 μη ασβεστοποιημένες αρτηριοσκληρυντικές πλάκες στεφανιαίων αρτηριών και 1 πλάκα μαστικής αρτηρίας. Ως δείγματα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν τμήματα μη αρτηριοσκληρυντικού ιστού από αντίστοιχα μοσχεύματα (26 δείγματα από φυσιολογικές μαστικές αρτηρίες και 1 δείγμα από φυσιολογική σαφηνή φλέβα). Όλα τα δείγματα καταψύχθηκαν άμεσα στους -80$^{o}$ C.

Κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού- συμπεριλαμβανομένης ηλικίας, φύλου, καπνιστικών συνηθειών, ιστορικού σακχαρώδους διαβήτη, δυσλιπιδαιμίας και υπέρτασης- επίσης καταγράφηκαν.

Το κάπνισμα καθορίστηκε ως η παρούσα ή η παρελθούσα χρήση καπνού. Ο σακχαρώδης διαβήτης ως επίπεδο γλυκόζης νηστείας μεγαλύτερο από 126mg/dl ή θεραπεία με διαιτητική τροποποίηση, από του στόματος υπογλυκαιμικούς παράγοντες ή ινσουλίνη, κατά το χρόνο της μελέτης. Η υπέρταση καθορίστηκε ως συστολική αρτηριακή πίεση μεγαλύτερη από 140mmHg και/ή διαστολική πίεση μεγαλύτερη από 90mmHg σε τουλάχιστον τρεις μετρήσεις ή αν τέτοια διάγνωση είχε γίνει στο παρελθόν και ο ασθενής θεραπευόταν με φάρμακα ή αλλαγή του τρόπου ζωής. Η δυσλιπιδαιμία αν θεραπευόταν με φάρμακα που ελαττώνουν τα λιπίδια ή διαιτητική τροποποίηση ή αν τα επίπεδα λιπιδίων ήταν μεγαλύτερα από εκείνα που συνιστώνται από την Τρίτη Συλλογική Δύναμη Καθήκοντος της Ευρωπαϊκής και Άλλων Κοινωνιών επί της Πρόληψης Καρδιαγγειακής Νόσου στην Κλινική Πράξη.

## 6.2 Εταιρείες προέλευσης υλικών

Αγαρόζη: Gibco BRL

Αιθανόλη: Merck

Βρωμιούχο αιθίδιο: Sigma

Buffer PCR: Fermentas

Δεσοξυριβονουκλεοτίδια: Promega

Κυανό της βρωμοφαινόλης: Sigma

$MgCl_2$: Fermentas

Πρωτεϊνάση Κ: Gibco BRL

Taq πολυμεράση: Fermentas

Φαινόλη: Gibco BRL

Χλωροφόρμιο: Fluka

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η PCR εφαρμόστηκε και στις αθηρωματικές πλάκες και στις μη αρτηριοσκληρυντικές αρτηρίες 26 ασθενών. Ο CMV ανιχνεύτηκε σε 9/26 ασθενείς (34.6%). Τρεις άρρενες ασθενείς ήταν θετικοί για CMV και στις αθηρωματικές πλάκες και στις φυσιολογικές μαστικές τους αρτηρίες. CMV DNA ανιχνεύθηκε μόνο στις αθηρωματικές πλάκες σε 3 άρρενες ασθενείς, ενώ 1 γυναίκα ασθενής ήταν θετική για CMV μόνο στην αθηρωματική πλάκα της μαστικής της αρτηρίας.

Επιπλέον ένας άνδρας ασθενής παρουσίαζε CMV μόνο στην φυσιολογική μαστική του αρτηρία, ενώ CMV ανιχνεύθηκε σε μία μόνο από τις αθηρωματικές πλάκες, αλλά όχι στην μαστική αρτηρία, μίας γυναίκας ασθενούς.

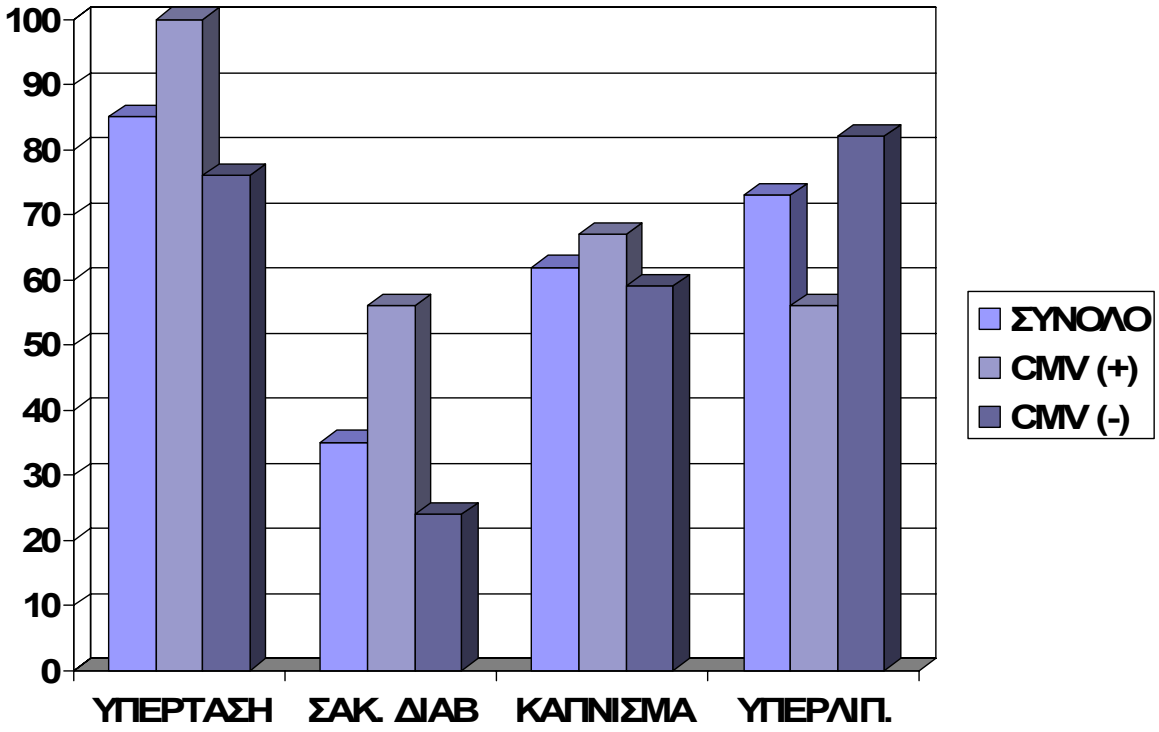
Το DNA του CMV ανιχνεύθηκε σε 9/40 αθηρωματικές πλάκες (22.5%) και 4/27 (14.81%) από τα μη αρτηριοσκληρυντικά αγγεία. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην συχνότητα του CMV ανάμεσα στις πλάκες και τους μη αρτηριοσκληρυντικούς ιστούς, p-value=0,4, υποδηλώνοντας ότι οι φυσιολογικές μαστικές αρτηρίες ήταν μολυσμένες εξίσου συχνά με τις αθηρωματικές πλάκες. Επιπλέον, καμιά στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στην παρουσία του CMV και τις κλινικές ή επιδημιολογικές παραμέτρους, περιλαμβανομένων ηλικίας, φύλου, αρτηριακής υπέρτασης, σακχαρώδους διαβήτη, καπνίσματος ή δυσλιπιδαιμίας.

**Πίνακας1:** CMV DNA που ανιχνεύθηκε σε αθηρωματικές πλάκες και φυσιολογικά αγγεία

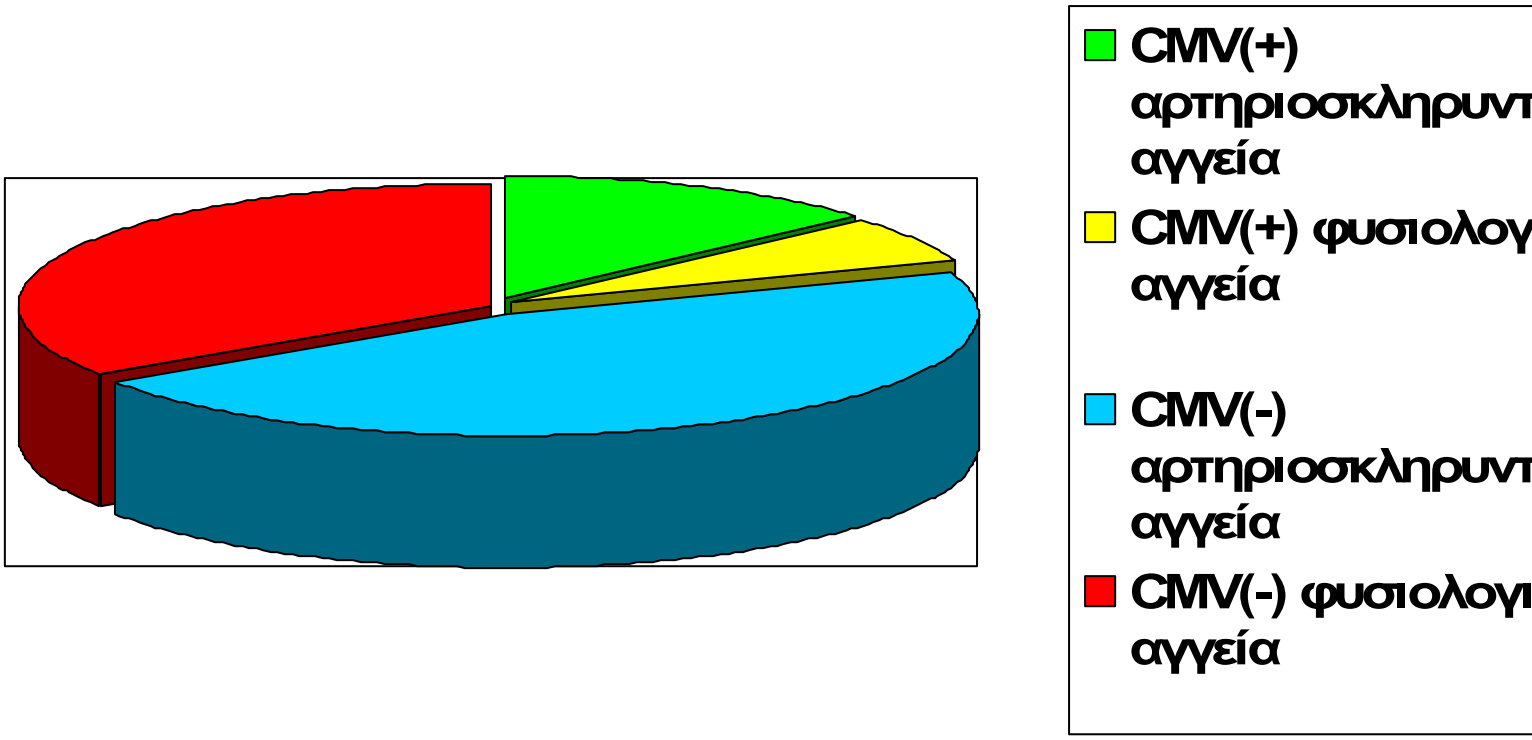
| | **Αθηρωματικές πλάκες** Αριθμός (%) | **Φυσιολογικά αγγεία** Αριθμός (%) | ***p* value** |
|---|---|---|---|
| **CMV θετικά** | 9 (22.5) | 4 (14.8) | 0.4 |
| **CMV αρνητικά** | 31 (77.5) | 23 (85.2) | |
| **Σύνολο** | 40 | 27 | |

**Πίνακας 2**: Χαρακτηριστικά ασθενών σε σχέση με την ανίχνευση CMV στις αρτηρίες

| | **Αριθμός ασθενών (%)** | **CMV +** | **CMV -** |
|---|---|---|---|
| Σύνολο | 26 | 9 | 17 |
| Μέση ηλικία | 66 | 61 | 68 |
| Άνδρες | 21 (81) | 7 (78) | 14 (82) |
| Γυναίκες | 5 (19) | 2 (22) | 3 (18) |
| Παρουσία παραγόντων κινδύνου για αρτηριοσκλήρυνση | | | |
| Αρτηριακή υπέρταση | 22 (85) | 9(100) | 13(76) |
| Σακχαρώδης διαβήτης | 9 (35) | 5 (56) | 4 (24) |
| Κάπνισμα | 16 (62) | 6 (67) | 10 (59) |
| Υπερλιπιδαιμία | 19 (73) | 5 (56) | 14 (82) |




**Γράφημα 1:** Συχνότητα συνήθων παραγόντων κινδύνου για αρτηριοσκλήρυνση.




**Γράφημα 2:** CMV DNA που ανιχνεύθηκε στις αθηρωματικές πλάκες και τα φυσιολογικά αγγεία

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αθηρογενετική διαδικασία μοιάζει από πολλές πλευρές με χρόνια φλεγμονή, μια απάντηση που μπορεί να προαχθεί από μικροοργανισμούς. Συνεπώς υπάρχουν ανασκοπήσεις που συζητούν τη σεβαστή υπόθεση της λοιμώδους αιτιολογίας της αρτηριοσκλήρωσης.

Μελέτες με πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι βακτηριακοί και ιικοί παράγοντες ίσως μπορούν να συνεισφέρουν στην αθηρογένεση. Για παράδειγμα και ο CMV και το *Chlamydia pneumoniae* που έχουν ευρεία εξάπλωση, μπορούν να μολύνουν τα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος, και να επιδείξουν χρόνιες, αφανείς και επανενεργοποιούμενες λοιμώξεις. Εντούτοις, οι πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης αρτηριοσκλήρωσης, από λοίμωξη, παραμένουν υποθετικοί.

Περίπου πριν δύο δεκαετίες, αρκετοί ερευνητές υποδήλωναν ένα ρόλο των ερπητοϊών στην καρδιαγγειακή νόσο. Υγιείς κότες που μολύνθηκαν με τον ιό της νόσου του Marek, ανέπτυξαν βλάβες που έμοιαζαν με της ανθρώπινης αρτηριοσκλήρωσης. Η ανοσοποίηση με ερπητοϊό της γαλοπούλας προστάτευε από τις βλάβες. Παρατηρήθηκε in vitro ότι μολυσμένα με ερπητοϊό αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα συσσώρευαν χοληστερόλη. Από τότε, οροεπιδημιολογικές, ιστοπαθολογικές, in vitro μελέτες και μελέτες σε ζώα, έχουν ερευνήσει την πιθανή σύνδεση ανάμεσα στην ανθρώπινη αρτηριοσκλήρυνση και τους ερπητοϊούς κυρίως τον CMV (123- 125, 114, 126 ).

Μελέτες έχουν συνδέσει τον CMV με τρεις αρτηριακές νόσους: πρώιμη αρτηριοσκλήρυνση, επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική και αρτηριοσκλήρυνση μετά από μεταμόσχευση καρδιάς. Για κάθε μια, οι οροεπιδημιολογικές μελέτες έχουν στηριχθεί σε μονές μετρήσεις ιικών IgG αντισωμάτων, τα οποία δείχνουν μόνο παρελθούσα έκθεση. Όπως με το *Chlamydia peumoniae*, οι πανταχού παρούσες σε όλο τον κόσμο, δια βίου, αφανείς λοιμώξεις από CMV, οι περιοδικές διακυμάνσεις των τίτλων των αντισωμάτων και των αντιγόνων, και οι επανενεργοποιήσεις του ιού μπορεί να αποκρύψουν ή να οδηγήσουν σε εσφαλμένη εντύπωση αιτιώδους συνάφειας. Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να εξηγήσουν την ασυνέπεια σε αναδρομικές, προοπτικές και μελέτες αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, που επιχειρούν να συνδέσουν τη συχνότητα ή τον

υψηλότερο τίτλο IgG αντισωμάτων με την πρώιμη αρτηριοσκλήρυνση (127, 123, 124, 128-131). Ταξινομήσεις της νόσου οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους (βασισμένες στην ιστοπαθολογία της αγγειακής χειρουργικής, σε υλικό από βιοψία, ή δείγματα από αρτηριεκτομή, στην αγγειογραφία, στην μη επεμβατική απεικόνιση των καρωτίδων, ή το κλινικό ιστορικό) και επιδημιολογικές μελέτες με μικρό αριθμό δειγμάτων, ελαττωμένη στατιστική σημαντικότητα μετά από προσαρμογή των στοιχείων, και μη ενιαία εξέταση των άλλων παραγόντων κινδύνου, επίσης περιορίζουν την ερμηνεία (123, 125, 126). Τα αποτελέσματα είναι συγκρουόμενα ακόμα και σε ακόμα και σε προοπτικές, nested case-control έρευνες που εστίαζαν, αλλά δεν περιορίζονταν σε άνδρες Καυκάσιους. Η Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC study) συσχέτιζε προϋπάρχοντες υψηλούς τίτλους anti-CMV και παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου με αρτηριοσκλήρυνση καρωτίδων, περιστατικά εμφράγματος του μυοκαρδίου και θανάτους από στεφανιαία νόσο (σχετικός κίνδυνος 1.76 95% διάστημα αξιοπιστίας 1.00-3.11) κατά τη διάρκεια 5ετούς παρακολούθησης (130). Αντίθετα η 12ετής Physician's Health Study δεν βρήκε καμιά συσχέτιση ανάμεσα στη συχνότητα των αντισωμάτων και το ακόλουθο πρώτο έμφραγμα μυοκαρδίου ή θρομβοεμβολικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ή αυξημένη C-reactive protein (CRP) (130), ενώ η Cardiovascular Health Study συσχέτισε τα αντισώματα στον ερπητοϊό herpes simplex virus τύπου 1 αλλά όχι τον CMV ή το *C.pneumoniae* με συμβάντα στους μεγαλύτερους σε ηλικία (132).

Σε επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική, προϋπάρχοντες και υψηλοί τίτλοι IgG αντισωμάτων κατά του CMV προέβλεπαν την επαναστένωση (43% έναντι 8%) ανεξάρτητα από παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, αλλά ο αριθμός των δειγμάτων ήταν μικρός και δεν περιλαμβανόταν ανάλυση της παρακολούθησης του τίτλου (125, 133, 134). Προοπτικές μελέτες και μελέτες αντιπροσωπευτικών δειγμάτων επίσης συνδέουν τον CMV με αρτηριοσκλήρυνση μετά μεταμόσχευση,(123, 135-137) στις οποίες μια ομάδα ανοσοκατεσταλμένων ληπτών καρδιακών μοσχευμάτων εκδηλώνει επισπευσμένα νόσο τον πρώτο χρόνο.

Ένδειξη CMV σε αυτές τις νοσολογικές οντότητες, εντούτοις, δεν αποδεικνύει αιτιολογική συσχέτιση. Τεχνικές dot blot, in situ DNA υβριδισμού και PCR έχουν ανιχνεύσει ιικά αντιγόνα και νουκλεϊκά οξέα σε 0% έως 90% των πλακών (μέσος όρος 43%) αλλά επίσης και σε ποσοστό που δεν έχει στατιστικά σημαντική

διαφορά στις φυσιολογικές αρτηρίες, από τους ίδιους ασθενείς, ή υγιείς. (138, 139,143,148,101.)

Στην παρούσα μελέτη ασθενών-μαρτύρων (case-control study), ελέγξαμε και αθηροσκληρωτικά αρτηριακά δείγματα και υγιή αγγειακό ιστό για την παρουσία CMV DNA, εφαρμόζοντας την ευαίσθητη τεχνική της PCR.

Εκτελέσαμε και μια μεταανάλυση ανασκοπώντας παρόμοιες μελέτες από το 1989 ως τώρα, συμπεριλαμβάνοντας άρθρα που εκτιμούν την παρουσία του CMV DNA σε ανθρώπινους αρτηριοσκληρυντικούς αγγειακούς ιστούς.

Καταλήξαμε σε 13 μελέτες οι οποίες εκτιμούν το θέμα αυτό (Πίνακας 4). Οι 8 από τις 13 βασίζονταν στην παρατήρηση. Δεν είχαν δείγματα μάρτυρες και αναφέρονταν μόνο στη συχνότητα CMV DNA σε νοσούντα αγγειακό ιστό [140-147]. Πέντε μελέτες εφάρμοζαν case-control μεθοδολογία χρησιμοποιώντας υγιή αγγειακό ιστό ποικίλης προέλευσης ως δείγματα-μάρτυρες[99-101,59,148]. Από αυτές μία[59] χρησιμοποιούσε dot blot και in situ DNA υβριδισμό και μια άλλη[148] in situ υβριδισμό. Οι άλλες τρεις από τις πέντε case-control μελέτες εφάρμοζαν PCR για να ανιχνεύσουν CMV DNA στον αγγειακό ιστό[99-101].

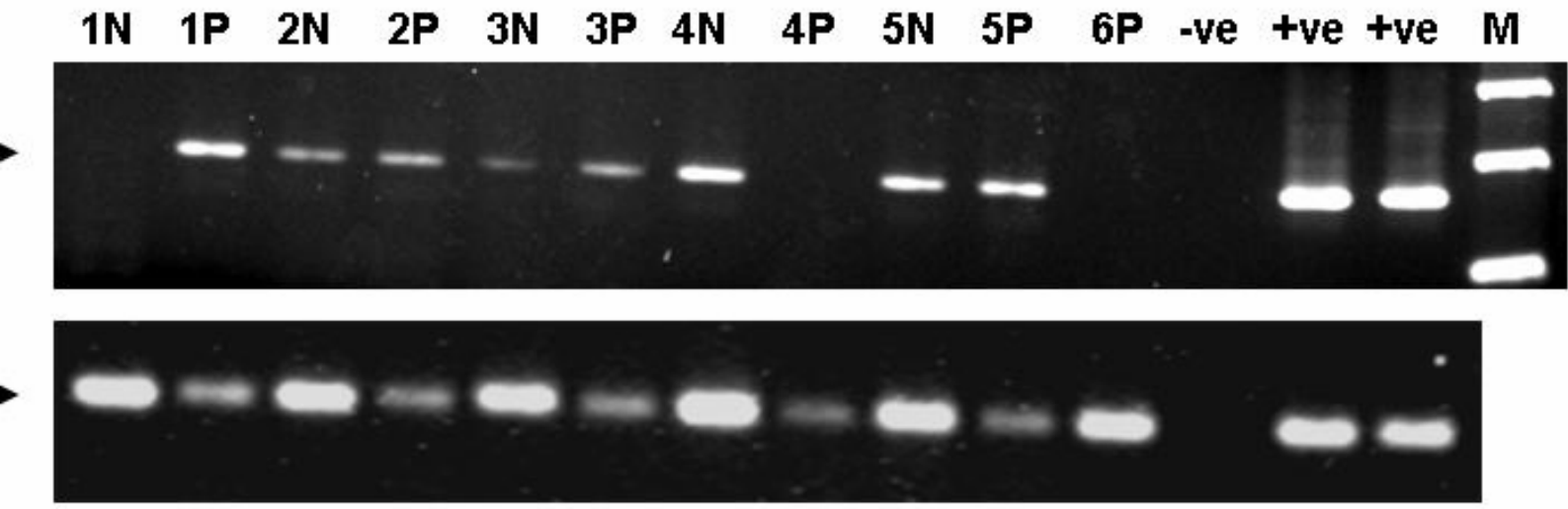
Λαμβάνοντας υπόψη την παρούσα μελέτη μαζί με τις 3 άλλες που χρησιμοποιούσαν τον ίδιο σχεδιασμό και την ίδια μεθοδολογία, βρήκαμε ότι, από 249 αρτηριοσκληρυντικά δείγματα που εξετάστηκαν, το CMV DNA ανιχνεύθηκε μόνο σε 16 δείγματα. Επιπροσθέτως, σε 173 δείγματα φυσιολογικού αγγειακού ιστού, το CMV DNA ανιχνεύθηκε σε 4 δείγματα (6.4% έναντι 2.3%, odds ratio=2.9, 95% διάστημα αξιοπιστίας: 0.95 έως 8.8, $p$=0.1). Βασιζόμενοι στην τελευταία παρατήρηση, επιβεβαιώνουμε και ενισχύουμε το αποτέλεσμα της μελέτης μας, ότι δεν υπάρχουν ενδείξεις που υποδηλώνουν μια συσχέτιση ανάμεσα στην ανίχνευση του CMV DNA σε αγγειακούς ιστούς και την αρτηριοσκλήρυνση.

**Πίνακας 3:** CMV DNA που ανιχνεύθηκε σε αθηρωματικές πλάκες και φυσιολογικά αγγεία, στην μεταανάλυση

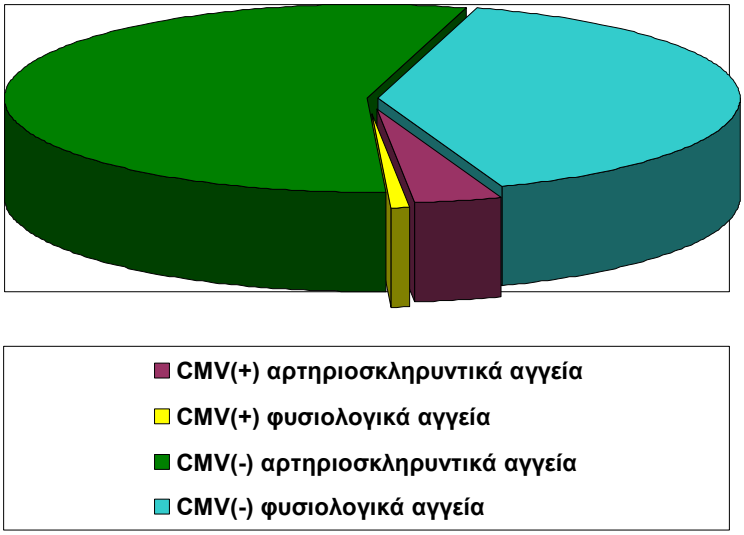
| | **Αθηρωματικές πλάκες** Αριθμός (%) | **Φυσιολογικά αγγεία** Αριθμός (%) | ***p* value** |
|---|---|---|---|
| **CMV θετικά** | 16 (6.4) | 4 (2.3) | 0.1 |
| **CMV αρνητικά** | 233 (93.6) | 169 (97.7) | |
| **Σύνολο** | 249 | 173 | |

**Εικόνα 11:** Ηλεκτροφόρηση από PCR για CMV στην 1η σειρά και ηλεκτροφόρηση από PCR για β2 μικροσφαιρίνη στη 2η σειρά.

**CMV**




**β2 μικροσφαιρίνη**




**Γράφημα 3:** CMV DNA που ανιχνεύθηκε σε αθηρωματικές πλάκες και φυσιολογικά αγγεία στην μεταανάλυση.

| Patients | | Controls | | Type of specimen | Method of detection | Author | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CMV positive | CMV negative | CMV positive | CMV negative | | | | |
| 9 | 31 | 4 | 23 | Coronary arteries<br>Mammary arteries<br>Saphenous veins | PCR | Xenaki et al, 2008 | |
| 5 | 43 | 0 | 66 | Coronary arteries<br>Carotid arteries<br>Saphenous veins | Real time PCR | Ibrahim et al, 2005 | 99 |
| 2 | 126 | 0 | 20 | Carotid arteries | PCR | Kwon et al, 2004 | 100 |
| 0 | 33 | 0 | 60 | Coronary arteries<br>Mammary arteries<br>Aortas | PCR | Pinar et al, 2004 | 101 |
| 0 | 50 | - | - | Carotid arteries | PCR | Hagiwara et al, 2007 | 140 |
| 0 | 83 | - | - | Carotid arteries | PCR | Latsios et al, 2004 | 141 |
| 3 | 15 | - | - | Basilary artery<br>Coronary artery<br>Thoracic aorta<br>Abdominal aorta<br>Renal arteries | Nested PCR | Rassu et al, 2001 | 142 |
| 0 | 40 | - | - | Carotid arteries | Immunohistochemistry<br>PCR | Saetta et al, 2000 | 143 |
| 9 | 8 | - | - | Carotid arteries | PCR | Qavi et al, 2000 | 144 |
| 2 | 21 | - | - | Carotid arteries | PCR | Hunter et al, 1999 | 145 |
| 0 | 29 | - | - | Coronary arteries | PCR | Daus et al, 1998 | 146 |
| 27 | 49 | - | - | Carotid arteries | Immunostaining | Chiu et al, 1997 | 147 |
| 27 | 3 | 18 | 16 | Abdominal aorta<br>Femoral artery | Dot blot and in situ DNA hybridization | Hendrix et al, 1990 | 59 |
| 19 | 25 | 22 | 8 | Abdominal aorta<br>Femoral artery | In situ hydridization | Hendrix et al, 1989 | 148 |

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.

# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Βάση των αποτελεσμάτων μας μπορούμε τώρα να συμπεράνουμε με σχετική βεβαιότητα ότι δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην ανίχνευση του CMV DNA σε αγγειακούς ιστούς και την αρτηριοσκλήρυνση.

Ακόμα κι αν υπήρχε, όμως, συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία του CMV στο αγγειακό τοίχωμα και την αρτηριοσκλήρυνση, η κλινική επίδραση μιας τέτοιας συσχέτισης θα ήταν περιορισμένη σε ένα μικρό μέρος των ασθενών, καθόσον η συνολική συχνότητα της παρουσίας CMV DNA σε αρτηριοσκληρυντικό αγγειακό ιστό είναι χαμηλή.

Ο CMV έχει την ικανότητα να παραμένει λανθάνων στο ανθρώπινο σώμα. Το αγγειακό τοίχωμα πιθανώς να αποτελεί περιοχή λανθάνουσας παραμονής του.

Η αυξημένη συχνότητα ανίχνευσης του CMV στο αγγειακό τοίχωμα αυτών των ασθενών πιθανόν να αντανακλά την αυξημένη συχνότητα οροθετικότητας για CMV των ενηλίκων.

Επιπλέον, άλλα μέλη της οικογένειας των ερπητοϊών, όπως ο HSV-1, ο HSV-2 και ο EBV έχουν επίσης ανιχνευθεί στο αγγειακό τοίχωμα, χωρίς προφανή κλινική σημασία.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ross R and Fuster V: The pathogenesis of atherosclerosis In Fuster V, Ross R and Topol E.J (eds): Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia, Lippincott- Raven, 1996, pp. 441-462.

2. Wolinsky H and Glagov S: Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals: Deviation of man from the usual pattern. Circ. Res. 25: 677, 1969.

3. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis- an update. N. Engl. J. Med. 314: 488, 1986.

4. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. Nature 362: 801, 193.

5. Renkin E.M: Multiple pathways of capillary permeability. Circ. Res. 41: 735, 1977.

6. Fielding C.J: Metabolism of cholesterol- rich chylomicrons: Mechanism of binding and uptake of cholesteryl esters by the vascular bed of the perfused rat heart J. Clin. Invest. 62: 141, 1978.

7. Lusher T.F: Imbalance of endothelium-derived relaxin and contracting factors: A new concept in hypertension? Am. J. Hypertens. 3: 317, 1990.

8. Jaffe E.A, Hoyer L.W and Nachman R.L: Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. J. Clin. Invest. 52: 2757, 1973.

9. Rubin K, Tingstrom A, Hansson G.K, et al: Induction of B-type receptors for platelet- derived growth factor in vascular inflammation: Possible implications for development of vascular proliferative lesions. Lancet 1: 1353, 1988.

10. Jaffe E.A, Minick C.R, Adelman B, et al: Synthesis of basement membrane by cultured human endothelial cells. J. Exp. Med. 144: 209, 1976.

11. Steinberg D: Lipoproteins and atherosclerosis: A look back and a look ahead. Arteriosclerosis 3: 283, 1983.

12. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimusa S, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 32: 411, 1988.

13. Cajdusek D.M, DiCorleto P.E, Ross R and Schwartz S.M: An endothelial derived growth factor. J. Cell. Biol. 85: 467, 1980.

14. Cajdusek D.M, DiCorleto P.E, Ross R and Schwartz S.M: Biochmical properties of the endothelium- derived growth factor: Comparison to other growth factors. J. Cell. Physiol. 114: 33, 1983.
15. DiCorleto P.E, and Bowen- Pope D.F: Cultured endothelial cells produce a platelet- derived growth factor- like protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 1919, 1983.
16. Loskutoff D.J and Curriden S.A: The fibrinolytic system of the vessel wall and its role in the control of thrombosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 598:238, 1990.
17. Sawdey M.S and Loskutoff D.J: Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo tissue specificity and induction by lipopolysaccharide tumor necrosis factor- alpha and transforming growth factor-beta. J. Clin. Invest. 88: 1346, 1991.
18. Moncada S and Higgs E.A: Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system. Amsterdam, Exerpta Medica, 1990.
19. Wissler R.W: The arterial medial cells, smooth muscle, or multifunctional mesenchyme? J. Atheroscl. Res. 8: 201, 1968.
20. Ross R: The smooth muscle cells. II Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. J. Cell. Biol. 50: 172, 1971.
21. Burke J.M and Ross R: Synthesis of connective tissue macromolecules by smooth muscle. Int. Rev. Connect. Tissue. Res. 8: 119, 1979.
22. Chait A, Ross R, Albers J.J and Bierman E.L: Platelet derived growth factor stimulates activity of low density lipoprotein receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4084, 1980.
23. Chamley- Campbell J, Campbell G and Ross R: Phenotype dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. J. Cell. Biol. 89: 379, 1981.
24. Thyberg J, Palmberg L, Nilsson J, et al: Phenotype modulation of primary cultures of arterial smooth muscle cells: On the role of platelet-derived growth factor. Differentiation 25: 156, 1983.
25. Schwartz S.M, Heimark R.L and Majesky M.W: Development mechanisms underlying pathology of arteries. Physiol. Rev. 70: 1177, 1990.
26. Hultgardh- Nilsson A, Krondahl V, Querol-Ferrer V and Ringertz N.R: Differences in growth factor response in smooth muscle cells isolated from adult and neonatal rat arteries. Differentiation 47: 99, 1991.

27. Doran A.C, Meller N, McNamara C.A: Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28(5): 812-9, 2008

28. Van Furth R: Current view on mononuclear phagocyte system. Immunobiology 161: 178, 1982.

29. Nathan C.F, Murray H.W and Cohn Z.A: Current concepts: The macrophage as an effector cell. N. Engl. J. Med. 303: 622, 1980.

30. Rosenfeld M.E, Khoo J.C, Miller E, et al: Macrophage derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low density lipoproteins and contain oxidation-specific lipid protein adducts. J. Invest. 87: 90, 1990.

31. Martin T.R, Altman L.C, Albert R.K and Henderson W.R: Leucotriene B4 production by human alveolar macrophage: A potential mechanism for amplifying inflammation in the lung. Am. Rev. Respir. Dis. 129: 106, 1984.

32. Bevilacqua M.P, Pober J.S, Cortan R.S and Gimbrone M.A, Jr: Interleukin 1 (IL-1) acts upon vascular endothelium to stimulate procoagulant activity and leucocyte adhesion. J. Cell. Biochem. 9A (Suppl.A):148, 1985.

33. Cathcart M.K, Morel D.W and Chisolm G.M: Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. J. Leukoc. Biol. 38: 341, 1985.

34. Ross R, Raines E.W and Bowen-Pope D.F: The biology of platelet derived growth factor. Cell 46: 155, 1986.

35. Shimokado K, Raines E.W, Madtes D.K, et al: A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. Cell 43: 277, 1985.

36. Raines E.W, Dower S.K and Ross R: IL-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. Science 243: 393, 1989.

37. Baird A, Mormede P, and Bohlen P: Immunoreactive fibroblast-growth factor in cells of peritoneal exudates suggests its identity with macrophage-derived growth factor. Bioch. Biophys. Res. Commun. 126: 358, 1985.

38. Ralph P: Colony stimulating factor. In Zembala and Asherson G (eds): Human monocytes. New York, Academic Press, 1989, p.228.

39. Assoian R.K, Komoriya A, Meyers C.A, et al: Transforming growth factor-b in human platelets: Identification of a major storage site, purification and characterization. J. Biol. Chem. 258: 7155, 1983.

40. Baumgartner H.R: Platelet interaction with vascular structures. Thromb. Diath. Haemmorrh. 51 (Suppl): 161, 1972.
41. Larsson P.T, Wallen N.H and Hjemdahl P: Norepinephrine-induced human platelet activation in vivo is only partly counteracted by aspirin. Circulation 89: 1951, 1994.
42. Grognani G, Soffiantino F, Zucchella M, et al: Platelet activation by emotional stress in patients with coronary artery disease. Circulation 83 (Suppl II): II 128, 1991.
43. Fuster V, Chesebro J.H, Frye R.L and Elveback L.R: Platelet survival and the development of coronary artery disease in the young adult: Effects of cigarette smoking, strong family history and medical therapy. Circulation 63: 546, 1981.
44. Ridker P.M, Hennekens C.H and Stampfer J.J: A prospective study of lipoprotein(s) and the risk of myocardial infarction. JAMA 270: 2195, 1993.
45. Kostner G.M, Czinner A, Pfeiffer K.H and Bihari- Varga M: Lipoprotein(a) concentrations as indicators for atherosclerosis. Arch. Dis. Child. 66:1054, 1991.
46. Emeson E.E and Robertson A.L, Jr: T lymphocytes in aortic and coronary intimas: Their potential role in atherogenesis. Am. J. Pathol. 130: 369, 1988.
47. Minick C.R and Murphy G.E: Experimental induction of atheroarteriosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich, cholesterol-poor diet.II. Effect of repeated injections of horse serum in rabbits fed a lipid- rich, cholesterol-poor diet. Am. J. Pathol. 73: 265, 1973.
48. Hansson G.K, Holm J and Jonasson L: Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. Am. J. Pathol. 135: 169, 1989.
49. Libby P and Hansson G.K: Involvement of the immune system in human atherogenesis: Current knowledge and unanswered questions. Lab. Invest. 64: 5, 1991.
50. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad rang of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID ) Study Group. N. Engl. J. Med. 339: 1349, 1998.
51. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet. 344: 1383, 1998.

52. Ross R, Glomset J.A: The pathogenesis of atherosclerosis. N. Engl. J. Med. 295: 369, 1976.
53. Davies P.F, Reidy M.A, Goode T.B, Bower D.E: Scanning electron microscopy in the evaluation of endothelial integrity of the fatty lesion in atherosclerosis. Atherosclerosis. 25: 125, 1976.
54. Ross R, Glomset J, Harker L: Response to injury and atherogenesis. Am. J. Pathol. 86: 675, 1977.
55. Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D.F, Raines E.W: The role of endothelial injury and platelets and macrophage interactions in atherosclerosis. Circulation 70: 77, 1984.
56. Jonasson L, Holm J, Skalli O, et al: Regional accumulations of T- cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. Arteriosclerosis. 6: 131, 1986.
57. Stemme S, Faber B, Holm J, et al: T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 3893, 1995.
58. Thom D.H, Wang S.P, Grayston J.T, et al: Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. Arterioscler. Thromb. 11:547, 1991.
59. Hendrix M.G, Salimans M.M, van Boven C.P, Bruggeman C.A: High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. Am. J. Pathol. 136: 23, 1990.
60. Gupta S, Pablo A.M, Jiang X, et al: IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. J. Clin. Invest. 99: 2752, 1997.
61. Nakashima Y, Raines E.W, Plump A.S, et al: Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18: 842, 1998.
62. Aiello R.J, Bourassa P.A, Lindsey S, et al: Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol. 19: 1518, 1999.
63. Ni W, Egashira K, Kitamoto S, et al: New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation 103: 2096, 2001.

64. Elhage R, Jawien J, Rudling M, et al: Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. Cardiovasc. Res. 59: 234, 2003.
65. Tenger C, Sundborger A, Jawien J, Zhou X: IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T-cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25: 791, 2005.
66. Mach F, Schonbeck U, Shukhova G.K, et al: Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling. Nature 394: 200, 1998.
67. Welt F.G, Rogers S.D, Zhang X, et al: GP IIb/IIIa inhibition with eptifibatide lowers levels of soluble CD40L and RANTES after percutaneous coronary intervention. Catheter Cardiovasc. Interv. 61: 185, 2004.
68. Alber H.F, Frick M, Suessenbacher A, et al: Effect of atorvastatin on circulating proinflammatory T-lymphocyte subsets and soluble CD40 ligand in patients with stable coronary artery disease- a randomized, placebo-controlled study. Am. Heart J. 151: 139, 2006.
69. Tousoulis D, Antoniades C, Nikolopoulou A, et al: Interaction between cytokines and sCD40L in patients with stable and unstable coronary syndromes. Eur. J. Clin. Invest. 37: 623, 2007.
70. Robertson A.K, Rudling M, Zhou X, et al: Disruption of TGF-beta signaling in T-cells accelerates atherosclerosis. J. Clin. Invest. 112: 1342, 2003.
71. Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson G.K: Transfer of CD4(+) T cells aggrevates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. Circulation 102: 2919, 2000.
72. Ross R: Atherosclerosis- an inflammatory disease. New Engl. J. Med. 340: 115, 1999.
73. Gimbrone M.A, Jr: Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis. Am. J. Pathol. 155: 1, 1999.
74. Boren J, et al: Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. J. Clin. Invest. 101: 2658, 1998.
75. Cyrus T, et al: Disruption of 12/15 lipoxygenase diminishes atherosclerosis in apoE deficient mice. J. Clin. Invest. 103: 1597, 1999.
76. Podrez E.A, et al: Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive mitogen species. J. Clin. Invest. 105: 1095, 2000.

77. Marathe S, Kuriakose G, Williams K and Tabas I: Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis , is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. Arterioscler. Thromb. Biol. 19: 2648, 1999.
78. Jandeleit-Dahm K, Copper M.E: The role of AGEs in cardiovascular disease. Curr. Pharm. Des. 14: 979, 2008.
79. Gounopoulos P, Merki E, Hansen L.F, Choi S.H, Tsimikas S: Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease. Minerva Cardioangiol. 55: 821, 2007.
80. Yu R, Yekta B, Vakili L, Gharavi N, Navab M, Marelli D, Ardehali A: Proatherogenic high-density lipoprotein, vascular inflammation and mimetic peptides. Curr. Atheroscler. Rep. 10: 171, 2008.
81. Galkina E, Ley K: Leucocyte influx in atherosclerosis. Curr. Drug Targets. 8: 1239, 2007.
82. Hansson G.K: Vaccination against atherosclerosis: science or fiction? Circulation 106: 1599, 2002.
83. Aldons J Lusis: Atherosclerosis. Nature 407: 233, 2000.
84. Suzuki H, et al: A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. Nature 386: 292, 1997.
85. Febbraio M, et al: Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects again athrosclerosis lesion development in mice. J. Clin. Invest. 105: 1049, 2000.
86. Tontoroz P, Nagy L, Alvarez J.L, Thomazy V.A and Evans R.M: PPAR gamma promotes monocyte /macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. Cell 93: 241, 1998.
87. Libby P: Changing concepts of atherogenesis. J. Intern. Med. 247: 349, 1999.
88. Watson K.E, et al: TGF-β1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-vascular cells to calcify. J. Clinic. Invest. 93: 2106, 1994.
89. Moultan K.S and Folkman J: In Molecular Basis of Cardiovascular Disease. (e.d Chien, K.R) p393 ( Saunders, Philadelphia, 1999.)
90. Schonbeck U, et al: CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. Am. J. Pathol. 156: 7, 2000.
91. Hegele R.A. Paraoxonase-genes and disease. Ann. Med. 31: 217, 1999.

92. Shib D.M, et al: Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E-knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. J. Biol. Chem. 276: 17527, 2000.
93. Virmani R, Burke A.P, Farbe A, et al: Pathology of the unstable plaque. Prog. Cardiovasc. Dis. 44: 349, 2002.
94. Naghavi M, Libby P, Falk E, et al: From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: Part I Circulation 108: 1664, 2003.
95. Naghavi M, Libby P, Falk E, et al: From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies: Part ii Circulation 108: 1772, 2003.
96. Beltowski J, Jamroz-Wisniewska A, Widomska S: Adiponectin and its role in cardiovascular diseases. Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets 8: 7, 2008.
97. Rahman MM, Laher I: Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. Curr. Vasc. Pharmacol. 5: 276, 2007.
98. Linke A, Erbs S, Hambrecht R: Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease. Front. Biosci. 13: 424, 2008.
99. Ibrahim A.I, Obeid M.T, Jouma M.J, Moasis G.A, Al-Richane W.L, Kindermann I, Boehm M, Roemer K, Mueller-Lantzsch N, Gartner B.C: Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Eptein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected by pass grafts. J. Clin. Virol. 32: 29, 2005.
100. Kwon T.W, Kim D.K, Ye J.S, Lee W.J, Moon M.S, Joo C.H, Lee H, Kim Y.K: Detection of enterovirus, cytomegalovirus and Chlamydia pneumoniae in atheromas. J. Microbiol. 42: 299, 2004.
101. Pinar A, Oc M, Akyon Y, Farsak B, Kocyildirim E, Us D, Zorlutuna Y, Tokgozoglu L, Boke E: The presence of Chlamydophila pneumoniae, Helicobacter pylori and cytomegalovirus in human atherosclerosis detected by molecular and serological methods. Mikrobiyol. Bul. 38: 213, 2004.
102. O'Connor S, Taylor C, Campbell L.A, Epstein P and Libby P: Potential infectious etiologies of atherosclerosis. A multifactorial perspective. Emerging Infectious Diseases 7: 780, 2001.

103. Shi Y, Tokunaga O: Herpes virus (HSV, EBV and CMV) infections in atherosclerotic compared with non atheroscletotic aortic tissue. Pathol. Intern. 52: 31, 2002.
104. Liu R, Moroi M, Yamamoto M, Kubota T, Ono T, Funatsu A, Komatsu H, Tsuji T, Hara H, Hara H, Nakamura M, Hirai H, Yamaguchi T: Presence and severity of Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus infection in coronary plaques are associated with acute coronary syndromes. Int. Heart J 47: 511, 2006.
105. Clinical Virology (editors) Richman DD, Whitley R.J, Hayden F.G.
106. Diagnostic Virology. Storch G.A
107. Westphal M, Lautenschlager I, Backhaus C, Loginov R, Kundt G, Oberender H, Stamm C, Steinhoff G: Cytomegalovirus and proliferative signals in the vascular wall of CABG patients. Thorac. Cardiovasc. Surg. 54: 219, 2006.
108. Streblow D.W, et al: The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. Cell 99: 511, 1999.
109. Carlquist J.F, Muhlestein J.B, Horne B.D, Hart N.I, Lim T, Habashi J, Anderson J.G, Anderson J.L: Cytomegalovirus stimulated mRNA accumulation and cell surface expression of the oxidized LDL scavenger receptor CD36. Atherosclerosis 177: 53, 2004.
110. Guevara N.V, Kim H.S, Antonova E.L and Chang L: The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. Nature Med 5: 335, 1999.
111. Speir E, Modali R, Huang E.S, Leon M.B, Shawl F, Finkel T, Epstein S.E: Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. Science 265: 391, 1994.
112. Guetta E, Guetta V, Shibutani T, Epstein S.E: Monocytes harboring cytomegalovirus: interactions with endothelial cells, smooth muscle cells and oxidized low density lipoprotein. Possible mechanisms for activating virus delivered by monocytes to sites of vascular injury.
113. Speir E, Yu Z.X, Takeda K, Ferrans V.J, Cannon R.O 3rd: Antioxidant effect of estrogen on cytomegalovirus induced gene expression in coronary artery smooth muscle cells. Circulation 102: 2990, 2000.
114. Epstein S.E, Jhou Y.F, Jhou J.H: Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. Circulation 100: 20, 1999.

115. Zhou Y.F, Shou M, Guetta E, Guzman R, Unger E.F, Yu Z.X, et al: Cytomegalovirus infection of rats increases the neointimal response to vascular injury without consistent evidence of direct infection of the vascular wall. Circulation 100: 1569, 1999.
116. Saiki R.K, Gelfand D.H, Stoffel S, Scharf S.J, Higushi R, Hom G.T, et al: Primer directed enzymatic amplification of DNA with q thermostable DNA polymerase. Science 239: 487, 1988.
117. Strachah T, Read A.P: Human molecular genetics. Oxford Bios. Scientific Publishers, 1996.
118. Taylor G: Polymerase chain reaction: basic principles and automation.
119. Chamberlain J.S, Gibbs R.A, Ranier J.E, Nguyen N and Caskey C.T: Detection screening of the pucheme muscular distrophus locus via multiplex DNA amplification. Nucl. Acid Res. 16: 1141, 1988.
120. Φυσιολογία και φυσιοπαθολογία του αίματος και των αιμοποιητικών οργάνων. Γ. Ηλιόπουλος.
121. Μοριακή ογκολογία. Δ.Α Σπαντίδος.
122. Handyside A.H, Kontogianni E.H, Hardy K and Winston R.M: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. Nature 344: 768, 1990.
123. Mattila K.J, Valtonen V.V, Nieminen M.S, Asikainen S: Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction and stroke. Clin. Infect. Dis. 26: 719, 1998.
124. Danesh J, Collins R, Peto R: Chronic infection and coronary heart disease. Is there a link? Lancet 350: 430, 1997.
125. Nieto F.J: Viruses and atherosclerosis: a critical review of the epidemiologic evidence. Am. Heart. J. 138: 453, 1999.
126. Libby P, Egan D, Skarlatos S: Role of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. Circulation 98: 4095, 1997.
127. Kol A, Libby P: Molecular mediators of arterial inflammation: a role for microbial products? A. Heart J. 138: 450, 1999.
128. Ridker P.M, Kundsin R.B, Stampfer M.J, Poulin S, Hennekens C.H: Prospective study of Chlamydia pneumoniae IgG seropositivity and risks of future myocardial infarction. Circulation 99: 1161, 1999.

129. Ridker P.M, Hennekens C.H, Stampfer M.J, Wang F: Prospective study of herpes simplex virus, cytomegalovirus and the risk of future myocardial infarction and stroke. Circulation 98: 2796, 1998.
130. Sorlie P.D, Nieto F. J, Adam E, Folsom A.R, Shahar E, Massing M: A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus I and coronary heart disease. Arch. Intern. Med. 160: 2027, 2000.
131. Adler S.P, Hurk J.K, Wang J.B, Vetrovec G.W: Prior infection with cytomegalovirus is not a major risk factor for angiographically demonstrated coronary artery atherosclerosis. J. Infect. Dis. 177: 209, 1998.
132. Siskovick D.S, Swartz S.M, Corey L, Grayston J.T, Ashley R, Wang S-P, et al: Chlamydia pneumoniae, herpes simplex virus type 1, and cytomegalovirus and incident myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults: The Cardiovascular Health study.
133. Zhou Y.F, Leon M.B, Waclawiw M.A, Pompa J.J, Yu Z.X, Finkel T, et al: Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. N. Engl. J. Med. 335: 624, 1996.
134. Smith K, Paarsonnet J: Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherosclerosis. [Correspondence] N. Engl. J. Med. 336: 587, 1997.
135. Hosenpud J. D: Coronary artery disease after heart transplantation and its relation to cytomegalovirus. Am. Heart. J. 138: 469, 1999.
136. Weis M, von Scheidt W: Cardiac allograft vasculopathy: a review. Circulation 96: 2069, 1997.
137. Koskinen O, Lemstrom K, Mttila S, Hayry P, Nieminen M.S: Cytomegalovirus infection associated accelerated heart allograft arteriosclerosis may impair the late function of graft. Clin. Transplant. 10: 487, 1996.
Διδακτορική διατριβή Γεωργίου Φλουρή.
Διδακτορική διατριβή Δημητρίου Πανουτσόπουλου.
138. Melnick J.L, Hu C, Burek J, Adam E, DeBakey ME: Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. J. Med. Virol. 42: 170, 1994.
139. Horvath R, Cerny J, Benedik J, Hokl J, Jelikova I, Benedik J: The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis. J. Clin. Virol. 16: 17, 2000.

140. Hagiwara N, Toyoda K, Inoue T, Shimeda H, Ibayashi S, Iida M, Okada Y: Lack of association between infectious burden and carotid atherosclerosis in Japanese patients. J. Stroke Cerebrvasc. Dis. 16: 145, 2007.
141. Latsios G, Saetta A, Michalopoulos NV, Agapitos E, Patsouris E: Detection of cytomegalovirus, Helicobacter pylori and Chlamydophila pneumoniae DNA in carotid atherosclerotic plaques by the polymerase chain reaction. Acta Cardiol. 59: 652, 2004.
142. Rassu M, Cazzivillan S, Scagnelli M, Peron A, Bevilacqua PA, Facco M, Bertoloni G, Lauro FM, Zambello R, Bonoldi E: Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic arteries from various vascular regions. Atherosclerosis 158: 73, 2001.
143. Saetta A, Fanourakis G, Agapitos E, Davaris PS: Atherosclerosis of the carotid artery: absence of evidence for CMV involvement in atheroma formation. Cardiovasc. Pathol. 9: 181, 2000.
144. Qavi HB, Melnick JL, Adam E, DeBakey ME: Frequency of coexistence of cytomegalovirus and Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques. Cent Eur. J Public Health 8: 71, 2000.
145. Hunter GC, Henderson AM, Westerband A, Kobayashi H, Suzuki F, Yan ZQ, Sirsjio A, Putnam CW, Hansson GK: The contribution of inducible nitric oxide and cytomegalovirus to the stability of complex carotid plaque. J. Vasc. Surg. 30: 36, 1999.
146. Daus H, Ozbec C, Saage D, Scheller B, Schieffer H, Pfreundschuh M, Gause A: Lack of evidence for a pathogenic role of Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus infection in coronary atheroma formation. Cardiology 90: 83, 1998.
147. Chiou B, Viira E, Tucker W, Fong IW. Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. Circulation 96: 2144, 1997.
148. Hendrix MG, Dormans PH, Kitslaar p, Bosman F, Bruggeman CA: The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. Am. J. Pathol. 136: 23, 1990.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Angiology**
Volume XX Number X
Month XXXX xx-xx
© 2008 Sage Publications
10.1177/0003319708322390
http://ang.sagepub.com
hosted at
http://online.sagepub.com

# Detection of Cytomegalovirus in Atherosclerotic Plaques and Nonatherosclerotic Arteries

Evangelia Xenaki, MD, John Hassoulas, MD, PhD, Stavros Apostolakis, MD, PhD, George Sourvinos, PhD, and Demetrios A. Spandidos, PhD, DSc

Several studies have reported an association between infectious agents and atherosclerosis. Cytomegalovirus (CMV) is the most commonly implicated viral pathogen. However, the role of CMV in atherosclerosis remains obscure. The present study evaluated the presence of CMV DNA in atherosclerotic plaques and normal vessel walls. A total of 40 arterial specimens from coronary plaques and 27 samples from normal vessels were obtained from 26 patients who underwent aorto-coronary bypass surgery. The specimens were analyzed by polymerase chain reaction for the presence of the CMV immediate early genomic region. CMV DNA was detected in 9 out of 26 patients (34.6%). Viral DNA was detected in both nonatherosclerotic tissues and atherosclerotic plaques. No statistically significant differences were observed between normal and diseased vessels. Our findings, in accordance with previous studies, do not support a direct causative role of CMV in the development of atherosclerotic plaques.

***Keywords:*** cytomegalovirus; atherosclerotic plaque; healthy vascular tissue; polymerase chain reaction

Cardiovascular disease (CVD) is a major cause of morbidity and mortality in Western societies. Atherosclerosis is the underlying disorder of the majority of aspects of CVD.[1]

Atherosclerosis is a complex, multifactorial disease associated with numerous environmental risk factors that interact with the genetic background of the individual.[2,3] Elevated plasma cholesterol levels, hypertension, diabetes mellitus, and smoking are recognized as major inducers of endothelial damage.[4] However, several studies have reported an association between certain persistent viral and bacterial pathogens and atherosclerosis. The potential involvement of adenovirus, herpes simplex virus (HSV), Epstein–Barr virus (EBV), and *Helicobacter pylori* has been assessed. However, *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus (CMV) are the most commonly implicated pathogens.[5-18]

Cytomegalovirus belongs to the subfamily of β-herpesvirinae of the family Herpesviridae. In developing countries, the majority of people are infected during early adulthood, whereas in developed countries, more than 70% of humans are infected by the age of 65.[19] The virus causes latent infections and periodically reactivates. In the majority of immunocompetent patients, CMV infection is asymptomatic. In contrast, the virus results in adverse clinical outcome when immunodeficient patients are infected.[20]

Previous studies have assessed the role of CMV infection in atherosclerosis; however, the results are quite contradictory. In the present study, we assessed the potential implication of CMV in atherogenesis by comparing the incidence of viral DNA detection in atherosclerotic lesions and normal vessels.

From the Laboratory of Clinical Virology, Faculty of Medicine, University of Crete (EX, SA, GS, DAS) and Department of Cardiothoracic Surgery, University Hospital (JH), Heraklion, Crete, Greece.

Address correspondence to: Demetrios A. Spandidos, Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, PO Box 1527, Heraklion 710 03, Crete, Greece; e-mail: spandidos@spandidos.gr.

## Methods

### Patients

The study population consisted of 21 male and 5 female patients with coronary artery disease (CAD) with a median age 66 years (range 43-78 years). All patients underwent coronary artery bypass grafting at the University Hospital of Crete between February 2005 and May 2005. Vascular segments were collected during surgery, from internal mammary artery grafts (peripheral part), saphenous veins, and coronary arteries (at the site of anastomosis). All samples were immediately separated into 2 parts. One part was collected and fixed immediately in 10% neutral-buffered solution containing about 4% formaldehyde for 24 hours and embedded in paraffin for conventional histology. The second part of all samples was immediately stored at 4°C for further DNA analysis. Histopathological examination classified vascular tissue into 2 categories: normal vessels or atheroscleorotic tissue (lesions II-VI in American Heart Association [AHA] classification).[21] The study protocol was approved by the institute's ethical committee. Informed consent was obtained from all the participants. Specimens were obtained from 39 noncalcified atherosclerotic plaques of coronary arteries and 1 plaque of mammary artery. As controls, nonatherosclerotic tissue from the respective bypass grafts was used (26 specimens from normal mammary arteries and 1 specimen from a normal saphenous vein). Clinical and epidemiological characteristics of the studied population—including age, sex, smoking habits, history of diabetes mellitus, dyslipidemia, and hypertension—were also recorded. Smoking was defined as a current or a prior history of tobacco use. Diabetes was defined as a fasting blood glucose level more than 126 mg/dL or treatment with dietary modification, oral hypoglycaemic agents, or insulin at the time of the study. Hypertension was defined as systolic blood pressure greater than 140 mm Hg and/or diastolic pressure more than 90 mm Hg on at least 3 occasions, or if such a diagnosis had been made in the past and the patient was being treated with medication or lifestyle modification. For patients with established CAD prior to the study, dyslipidemia was defined as treatment with lipid lowering medication or dietary modification or lipid levels greater than those recommended by the Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice[22] (Table 1).

**Table 1.** Clinical and Epidemiological Characteristics of Patients[a]

| | Patients, *n* (%) | CMV Positive, *n* (%) | CMV Negative, *n* (%) |
|---|---|---|---|
| Median age (years) | 66 | 61 | 68 |
| Male gender | 21 (81) | 7 (78) | 14 (82) |
| Hypertension | 22 (85) | 9 (100) | 13 (76) |
| Diabetes mellitus | 9 (35) | 5 (56) | 4 (24) |
| Smoking | 16 (62) | 6 (67) | 10 (59) |
| Dyslipidemia | 19 (73) | 5 (56) | 14 (82) |
| Total | 26 | 9 | 17 |

Abbreviation: CMV, cytomegalovirus.
[a]Nonsignificant differences in all cases.

### DNA Extraction and Detection of CMV

DNA extraction was carried out as previously described.[23] All specimens were examined for the presence of amplifiable DNA using *beta2-microglobulin* as a reference gene. In all specimens, a part of sequence of the major immediate early region of CMV was examined by polymerase chain reaction (PCR) using the primers forward 5′-GTGACCAAG-GCCACGACGTT-3′ and reverse 5′-TCTGCCAG GACATCTTTCTC-3′. The reaction mix in all PCRs for CMV detection consisted of PCR buffer 1X, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.05 mM of each dNTP, 0.3 mM of each primer, and 0.65 units Taq DNA polymerase. The cycling conditions for CMV consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2.30 minutes; then 8 cycles of 94°C for 40 seconds, 57°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds; and 27 cycles of 94°C for 40 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds; and a final extension step at 72°C for 10 minutes. PCR products were visualized on a 2% agarose gel. At least 3 repetitions of PCR reactions were carried out for each specimen with a high reproducibility score.

### Statistical Analysis

Fisher's exact test was applied to estimate the association between the presence of viral DNA and atherosclerosis. To assess the independent effect of CMV on atherosclerosis, we included the presence of CMV and the conventional risk factors of CAD in a multiple logistic regression analysis. In all cases, *P* values less than .05 were considered to be significant. The analyses were performed using SPSSv10 (SPSS Inc, Chicago, IL).

**Table 2.** CMV DNA Detected in Atherosclerotic Lesions and Normal Vessels

| | Atherosclerotic Lesions, n (%) | Normal Vessels, n (%) | *P* Value |
|---|---|---|---|
| CMV positive | 9 (22.5) | 4 (14.8) | 0.4 |
| CMV negative | 31 (77.5) | 23 (85.2) | |
| Total | 40 | 27 | |

Abbreviation: CMV, cytomegalovirus.

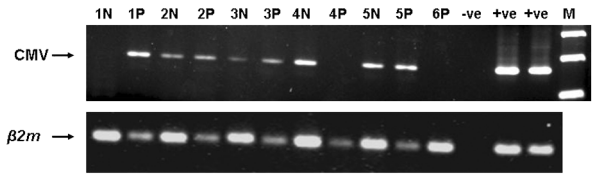



**Figure 1.** Representative examples of CMV positive atherosclerotic plaques (P) and normal vessel walls (N) in atherosclerotic patients. M, 100-bp ladder; –ve, negative control; +ve, positive control. The *beta2 microgloulin* (*?2m*) gene was amplified as a reference gene.

## Results and Discussion

PCR analysis was employed both in atherosclerotic plaques and nonatherosclerotic arteries from 26 patients. CMV was detected in 9/26 patients (34.6%). A total of 3 male patients were positive for CMV in both their plaques and the normal mammary arteries. CMV DNA was found only in the atherosclerotic plaques in 3 male patients, whereas 1 female patient was CMV positive only in the plaque of her mammary artery. An additional male patient presented CMV in the normal mammary artery alone, whereas CMV was detected in only 1 out of 3 atherosclerotic plaques, but not in the mammary artery, of 1 female patient. Representative examples of CMV positive samples by PCR are shown in Figure 1.

CMV DNA was detected in 9/40 (22.5%) atherosclerotic plaques and 4/27 (14.81%) nonatherosclerotic vessels (Table 2). Statistical analysis showed no significant difference in CMV incidence between the plaques and the nonatherosclerotic tissues, indicating that normal mammary arteries were infected as often as atherosclerotic plaques. Furthermore, no significant difference was observed between the presence of CMV and clinical or epidemiological parameters, including age, gender, arterial hypertension, diabetes mellitus, smoking, or hypercholesterolemia.

The potential pathogenic role of infectious agents in the initiation and progression of atherosclerosis remains obscure. Adenovirus, enterovirus, herpes simplex viruses, and Epstein–Barr virus have been assessed as potential inducers of endothelial damage. However, CMV is the most commonly implicated viral pathogen in the literature.[5-18]

In the present case–control study, we tested both atherosclerotic arterial specimens and healthy vascular tissue for the presence of CMV DNA, applying a well-established and sensitive technique. We did not observe any positive association between CMV and atherosclerosis. However, our study had limited statistical power and we were therefore unable to establish a definite negative association. In fact, small sample size has been the main limitation of every similar study reported in the scientific literature. Thus, to arrive at a plausible conclusion regarding the implication of CMV in atherosclerosis, we performed a mini meta-analysis by reviewing similar studies in the literature from 1989 to the present, including articles assessing the presence of CMV DNA in human atherosclerotic vascular tissue. We ended up with 13 studies assessing the subject (Table 3). The majority—9 out of 14 studies—were observational. They lacked control samples and reported the incidence of CMV DNA in diseased vascular tissue.[8-15] A total of 5 studies applied a case–control methodology using healthy vascular tissue of variable origin as control samples.[5-7,16,17] In all, 3 out of 5 case–control studies applied PCR to detect CMV DNA in vascular tissue.[5-7] Taking into consideration the present study along with the 3 studies that used the same design and methodology, we found that, of 249 atherosclerotic samples tested, CMV DNA was detected in only 16 samples. Additionally, in 173 samples of normal vascular tissue, CMV DNA was detected in 4 specimens (6.4% vs 2.3%; odds ratio = 2.9; 95% confidence interval, 0.95 to 8.8; $P = .062$). The latter observation remains under the cut off point of statistical significance. Nevertheless, because of the low overall rate of CMV detection in vascular specimens, the power of the given sample size remains low. We therefore cannot definitively conclude that there is a negative association between the detection of CMV DNA in vascular tissue and atherosclerosis.

The detection of viral DNA in the vascular wall per se cannot be considered an independent predisposing factor of CAD. Perhaps CMV infection needs the presence of another triggering factor to initiate athrogenesis. However, such a hypothesis would be

**Table 3.** Incidence of CMV Detection in Atherosclerotic Vascular Tissue[a]

| Patients | | Controls | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CMV Positive | CMV Negative | CMV Positive | CMV Negative | Type of Specimen | Method of Detection | Authors |
| 9 | 31 | 4 | 23 | Coronary arteries, mammary arteries, saphenous veins | PCR | Xenaki et al (2008), this study |
| 5 | 43 | 0 | 66 | Coronary arteries, carotid arteries, saphenous veins | Real time PCR | Ibrahim et al (2005)[5] |
| 2 | 126 | 0 | 20 | Carotid arteries | PCR | Kwon et al (2004)[6] |
| 0 | 33 | 0 | 60 | Coronary arteries, mammary arteries, aortas | PCR | Pinar et al (2004)[7] |
| 0 | 50 | — | — | Carotid arteries | PCR | Hagiwara et al (2007)[8] |
| 0 | 83 | — | — | Carotid arteries | PCR | Latsios et al (2004)[9] |
| 3 | 15 | — | — | Basilary artery, coronary artery, thoracic aorta, abdominal aorta, renal arteries | Nested PCR | Rassu et al (2001)[10] |
| 0 | 40 | — | — | Carotid arteries | Immunohisto chemistry PCR | Saetta et al (2000)[11] |
| 9 | 8 | — | — | Carotid arteries | PCR | Qavi et al (2000)[12] |
| 2 | 21 | — | — | Carotid arteries | PCR | Hunter et al (1999)[13] |
| 0 | 29 | — | — | Coronary arteries | PCR | Daus et al (1998)[14] |
| 27 | 49 | — | — | Carotid arteries | Immunostaining | Chiu et al (1997)[15] |
| 27 | 3 | 18 | 16 | Abdominal aorta, femoral artery | Dot blot and in situ DNA hybridization | Hendrix et al (1990)[16] |
| 19 | 25 | 22 | 8 | Abdominal aorta, femoral artery | In situ hydridization | Hendrix et al (1989)[17] |

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; PCR, polymerase chain reaction.
[a]Figures represent the number of specimens tested.

difficult to prove or disprove by independent studies conducted with small sample sizes. Large-scale clinical trials need to be conducted for a possible interaction of CMV infection and other predisposing factors of CAD to be revealed.

In our opinion, the most important finding remains the low overall rate of detection of CMV DNA in atherosclerotic vascular tissue. Thus, even if there were an association between the presence of CMV in the vascular wall and atherosclerosis, the clinical impact of such an association would be limited to a small number of CAD patients. Furthermore, the etiopathogenesis of atherosclerotic cardiovascular disease is pretty much clear. Nine well-established and modifiable risk factors, account for almost 90% of the total risk of acute myocardial infarction.[24] Thus, there is little room for alternative theories implicating viral or bacterial infectious agents in atherogenesis.

However, why the vascular wall can host CMV still remains to be explained. CMV has the ability to remain latent in the human body, with the vascular wall probably serving as a site of CMV latency. Furthermore, other members of herpes viruses—such as HSV-1, HSV-2, and EBV—have also been detected in the vascular wall, without any obvious clinical implications.

We conclude that the CMV detected in the vascular wall might reflect the increased rate of CMV seropositivity in adults. Moreover, till date there is no convincing evidence to suggest a causative role for the virus in the development of atherosclerotic plaques.

## References

1. Gaziano MJ. Global burden of cardiovascular disease. In: Braunwald E, ed. *Heart Disease*. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2005:1-19.
2. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med*. 1994; 330:1041-1046.

3. Nora JJ, Lortscher RH, Spangler RD, Nora AH, Kimberling WJ. Genetic-epidemiologic study of early-onset ischemic heart disease. *Circulation.* 1980;61:503-508.
4. Wilson PW. Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Hypertens.* 1994;7: 7S-12S.
5. Ibrahim AI, Obeid MT, Jouma MJ, et al. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts. *J Clin Virol.* 2005;32:29-32.
6. Kwon TW, Kim DK, Ye JS, et al. Detection of enterovirus, cytomegalovirus, and *Chlamydia pneumoniae* in atheromas. *J Microbiol.* 2004;42:299-304.
7. Pinar A, Oç M, Akyön Y, et al. The presence of *Chlamydophila pneumoniae*, *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus in human atherosclerosis detected by molecular and serological methods [in Turkish]. *Mikrobiyol Bul.* 2004;38:213-222.
8. Hagiwara N, Toyoda K, Inoue T, et al. Lack of association between infectious burden and carotid atherosclerosis in Japanese patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2007;16:145-152.
9. Latsios G, Saetta A, Michalopoulos NV, Agapitos E, Patsouris E. Detection of cytomegalovirus, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* DNA in carotid atherosclerotic plaques by the polymerase chain reaction. *Acta Cardiol.* 2004;59:652-655.
10. Rassu M, Cazzavillan S, Scagnelli M, et al. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic arteries from various vascular regions. *Atherosclerosis.* 2001;158:73-79.
11. Saetta A, Fanourakis G, Agapitos E, Davaris PS. Atherosclerosis of the carotid artery: absence of evidence for CMV involvement in atheroma formation. *Cardiovasc Pathol.* 2000;9:181-183.
12. Qavi HB, Melnick JL, Adam E, DeBakey ME. Frequency of coexistence of cytomegalovirus and *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques. *Cent Eur J Public Health.* 2000;8:71-73.
13. Hunter GC, Henderson AM, Westerband A, et al. The contribution of inducible nitric oxide and cytomegalovirus to the stability of complex carotid plaque. *J Vasc Surg.* 1999;30:36-49.
14. Daus H, Ozbek C, Saage D, et al. Lack of evidence for a pathogenic role of *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus infection in coronary atheroma formation. *Cardiology.* 1998;90:83-88.
15. Chiu B, Viira E, Tucker W, Fong IW. *Chlamydia pneumoniae*, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation.* 1997; 96:2144-2148.
16. Hendrix MG, Salimans MM, van Boven CP, Bruggeman CA. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1990;136:23-28.
17. Hendrix MG, Dormans PH, Kitslaar P, Bosman F, Bruggeman CA. The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients. *Am J Pathol.* 1989;134: 1151-1157.
18. Melnick JL, Hu C, Burek J, Adam E, DeBakey ME. Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. *J Med Virol.* 1994;42:170-174.
19. Horváth R, Cerný J, Benedík J Jr, Hökl J, Jelínková I, Benedík J. The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis. *J Clin Virol.* 2000;16:17-24.
20. Steininger C. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:953-963.
21. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. 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;92:1355-1374.
22. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice: European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2003;10:1-78.
23. Panutsopulos D, Papalambros E, Sigala F, Zafiropoulos A, Arvanitis DL, Spandidos DA. Protein and mRNA expression levels of VEGF-A and TGF-beta1 in different types of human coronary atherosclerotic lesions. *Int J Mol Med.* 2005;15:603-610.
24. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364:937-952.