

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Ο ρόλος της χημοκίνης CXCL8 (IL-8) και των υποδοχέων της CXCR1 και
CXCR2 στην παθογένεια της στεφανιαίας νόσου**

Επιβλέπων Καθηγητής
Δημήτριος Α. Σπαντίδος

Διδακτορική Διατριβή
Κωνσταντίνας Ι. Βογιατζή



Ηράκλειο 2012

Στη γιαγιά μου Χρύσα

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιοχημείας και Ανοσολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας. Το ανθρώπινο υλικό της μελέτης προέρχεται από την Καρδιολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και την αντίστοιχη Κλινική του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου. Το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Γενική Συνέλευση του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και την Επιστημονική Επιτροπή του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Ευχαριστίες μέσα από την καρδιά μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Επιβέποντα Καθηγητή κ. Δ. Σπαντίδο, τον Επικ. Καθηγητή κ. Γ. Σουρβίνο και τον Επικ. Καθηγητή κ. Γ. Κοχιαδάκη που συνέβαλαν καθοριστικά στην έναρξη και ολοκλήρωση της παρούσας Διαδακτορικής Διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Η. Κραμποβίτη για την έμπρακτη συμπαράστασή του.

Ευχαριστίες στον Καθηγητή Καρδιολογίας και Διευθυντή της Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης κ. Π. Βάρδα καθώς και το Διευθυντή του Β΄ Καρδιολογικού Τμήματος του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου για την παροχή των αναγκαίων για την περάτωση της Διατριβής δειγμάτων και Υλικών.

Εγκάρδιες ευχαριστίες στον Λέκτορα κ. Σ. Αποστολάκη για την καταβολή προσωπικού χρόνου, κόπου και αδιαμφισβήτητης διανοίας χωρίς τα οποία θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Χ. Βλατά καθώς και σε όλους τους «συνεργάτες-συμφοιτητές», μέλη των εργαστηρίων και των κλινικών του Πανεπιστημίου Κρήτης για κάθε μικρή και μεγάλη βοήθεια καθώς και για κάθε μικρή και μεγάλη ανάμνηση από αυτό που προσωπικά αναγνωρίζω ως τα Καλύτερά μου χρόνια! Ευχαριστώ.

Κωνσταντίνα Βογιατζή

Ναύπλιο, 06/07/2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΝΤΙ ΓΙΑ ΠΡΟΛΟΓΟ	6
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ)	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ	18
ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ	19
ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ	20
Επιδημιολογία	20
Στοιχεία ανατομίας- φυσιολογίας	21
Παθοφυσιολογία Στεφανιαίας Νόσου	24
Παράγοντες κινδύνου	25
ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ	26
Αθηροσκλήρωση και φλεγμονή	28
IL-8 και αθηροσκλήρωση	30
In vitro μελέτες και ζωικά μοντέλα	33
ΟΜΑΔΕΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	36
Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη	36
A. Αθηροσκλήρωση και Στεφανιαία Νόσος	36
B. Αθηροσκλήρωση και Επαναστένωση	38
Κλινικά χαρακτηριστικά	40

ΜΕΘΟΔΟΙ	41
Καρδιακός καθετηριασμός	41
Γονοτυπική Ανάλυση	42
Διαδικασία αλληλούχισης (Sequencing)	44
Κυτταροκαλλιέργειες	47
Κυτταρομετρία ροής (FACS)	48
ELISA	49
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	52
Γονοτυπική ανάλυση	52
FACS/ ELISA	53
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
Γονοτυπική ανάλυση	54
Α. IL-8 και Στεφανιαία Νόσος	54
Β. IL-8 και επαναστένωση	58
Κυτταροκαλλιέργειες	62
Α. Σύνθεση IL-8	62
Β. Φαινότυπος CXCR1/CXCR2	63
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
Α. IL-8 και Στεφανιαία Νόσος	67
Β. IL-8 και επαναστένωση	70
Γ. IL-8 και THP-1 κύτταρα	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ (Δημοσιευμένα άρθρα - Βιογραφικό Σημείωμα)	88

ΑΝΤΙ ΓΙΑ ΠΡΟΛΟΓΟ

(Απόσπασμα από το θεατρικό έργο του Αρκά «Εχθροί εξ αίματος», Εκδόσεις

Γράμματα, 2007)

- λέω. Λοιπόν, γιατί να μην την κά-
νουμε για έναν οργανισμό πιο νέο,
πιο γερό ώστε να έχουμε μπροστά
μας τριάντα-σαράντα χρονάκια
γεμάτα; Κατάλαβες;
- ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ Όχι.
- ΛΕΠΤΟ ΕΝΤΕΡΟ Εγώ όμως κατάλαβα. Τώρα που τα
συνδύασα όλα στο μυαλό μου, κα-
τάλαβα... Γι' αυτό μάζεψε τα λόγια
του για την Καρδιά: «που είναι...
και γιατί αργεί... και ανησυχώ»...
Κατάλαβες;
- ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ Όχι, σου είπα!
- ΛΕΠΤΟ ΕΝΤΕΡΟ Ετοιμάζονται να μας τελειώσουν,
ρε βλάκα, για να φύγουν μια ώρα
αρχύτερα. Θα κάνει εκούσια ανα-
κοπή η Καρδιά και τέρμα.
- ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ Τρελάθηκες;! Αυτό είναι εσχάτη
προδοσία!
- ΛΕΠΤΟ ΕΝΤΕΡΟ Ναι, έχει ηθικές αναστολές αυτή
Αυτή είναι αδίσταχτη. Δεν
είδες τότε με τις αρρυθμίες; Όπως
αποδείχτηκε, δεν είχε απολύτως
- τίποτα. Καπρίτσιο για να τη σπάσει
στον Μεγάλο, να του δείξει ποιος
κάνει πραγματικά κουμάντο.
- ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ Άλλο αυτό και άλλο να προκαλέσει
μόνη της ανακοπή. Αυτό είναι...
αυτό είναι... εσχάτη προδοσία!
Άκου ανακοπή!
- ΛΕΠΤΟ ΕΝΤΕΡΟ Ανακοπή, λέω εγώ. Μπορεί να
κανονίζει τίποτα άλλο. Είναι στη
μέση κι το
Δεξί Νεφρό... Μπορεί να ετοι-
μάζουν κάνα πνευμονικό οίδημα,
ξέρω 'γω; Μπορεί να είναι κι άλλα
όργανα στο κόλπο.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

IL- 8: Ιντερλευκίνη 8

FKN: Fractalkine

CXCR1 : CXC motif Receptor 1

CXCR2 : CXC motif Receptor 2

MEA : Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης

α-MEA : Αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης

ACE: Angiotensin converting enzyme

IFN-γ: Interferon-gamma, (Ιντερφερόνη-γ)

TNF-α: Tumor necrosis factor-alpha (Παράγων νέκρωσης των όγκων-άλφα)

ΣΝ : Στεφανιαία νόσος

ΣΔ : Σακχαρώδης διαβήτης

CAD: Coronary artery disease

ACS: Acute Coronary Syndrome (Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο)

OEM: Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου

MI: Myocardial Infarction

PCI: Percutaneous Coronary Intervention (Διαδερμική Ενδοστεφανιαία Παρέμβαση)

ISR: In Stent Restenosis (Επαναστένωση Ενδοπροθέματος)

MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1 (Χημειοτακτική πρωτεΐνη για τα μονοκύτταρα)

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T- Cell Expressed and Secreted

ANG-I: Angiotensin I, (Αγγιοτενσίνη I)

ANG-II: Angiotensin II, (Αγγιοτενσίνη II)

α-AT1: Αναστολέας των AT1 υποδοχέων της αγγιοτενσίνης II

ARBs: Angiotensin receptor blockers

ECs: Endothelial cells

SMCs: Smooth muscle cells, (Λεία μυϊκά κύτταρα)

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells,
(Εμπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος)

PCR: Polymerase chain reaction, (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός)

RFLP: Restriction fragments length polymorphism,
(Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων)

FACS: Fluorescence-activated cell sorting (Κυτταρομετρία ροής)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ενζυμοσυνδεδεμένη
Ανοσοαπορροφητική Μελέτη)

LPS: Lipopolysaccharide (Λιποπολυσακχαρίτης)

SEM: Standard error of the mean (τυπικό σφάλμα)

SD: Standard deviation (Σταθερή απόκλιση)

OR: Odds ratio (Πηλίκιο διαγώνιων γινομένων)

CI: Confidence interval (Διάστημα αξιοπιστίας)

df: degrees of freedom

HWE: Hardy Weinberg equilibrium

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αθηροσκλήρωση είναι μια πολύπλοκη πολυπαραγοντική νόσος των μεσαίου και μεγάλου μεγέθους αρτηριών, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την προοδευτική συσσώρευση λείων μυϊκών κυττάρων, λιπιδίων και συνδετικού ιστού στον έσω χιτώνα και η οποία συνδέεται με πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου αλληλεπιδρώντες με το γενετικό υπόβαθρο του ατόμου.

Συνεχώς αυξανόμενα στοιχεία προκύπτουν σχετικά με τον φλεγμονώδη χαρακτήρα της αθηροσκλήρωσης.

Διάφοροι προφλεγμονώδεις παράγοντες, χημειοτακτικές κυττοκίνες (χημοκίνες), συνδετικά μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη ενορχήστρωση της συνολικής διαδικασίας. Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον στη σύγχρονη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο των χημοκινών στην αθηροσκλήρωση, εξαιτίας της εμπλοκής τους σε σημαντικές απόψεις της αθηρογένεσης, όπως την επιστράτευση φλεγμονωδών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα και τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων στις αθηροσκληρωτικές πλάκες.

Η Ιντερλευκίνη 8 (IL-8), πρότυπη χημοκίνη της υποομάδας CXC φαίνεται να εμπλέκεται στην αγγειακή παθολογία.

Με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στα γονίδια της χημοκίνης CXCL8 (IL-8) και των υποδοχέων της ενέχονται στην κλινική εκδήλωση άλλων νοσημάτων όπως το βρογχικό άσθμα, η Πολλαπλή Σκλήρυνση και η RSV λοίμωξη.

Σ' αυτό το πλαίσιο εξετάστηκαν δύο από τους πέντε γνωστούς πολυμορφισμούς, οι -251 A/T και 781 C/T του εκκινήτη του γονιδίου της IL-8 και η συχνότητα εμφάνισής τους σε σχέση με την ύπαρξη ή μη στεφανιαίας νόσου.

Για το σκοπό αυτό συγκεντρώθηκαν δείγματα αίματος από 300 στεφανιαίους ασθενείς (CAD patients) και 189 υγείς μάρτυρες (Controls), στεφανιογραφικά

ελεγμένους. Τα δείγματα DNA κατατάχθηκαν σε ομόζυγα και ετερόζυγα ως προς τον υπό μελέτη πολυμορφισμό. Επιπλέον έγινε επιβεβαίωση της ύπαρξης και της θέσης του πολυμορφισμού -251 A/T με τη μέθοδο της αλληλούχισης (Sequencing).

Στη διαδικασία γονοτυπικής- φαινοτυπικής συσχέτισης συμπεριλήφθηκαν 241 άτομα από τους ασθενείς και 157 άτομα από τους υγιείς μάρτυρες. Στον ίδιο πληθυσμό καταγράφηκε και η κλινική μορφή εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου (σταθερή-ασταθής στηθάγχη, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου). Με αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατή η περαιτέρω κατάταξη των μελών της ομάδας των ασθενών σε δύο υποομάδες: α. Ασθενείς με Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο (ACS group, n=121) και β. Ασθενείς με σταθερή νόσο (non ACS group, n=120). Η ανάλυση έδειξε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των δύο γονιδιακών τόπων ($D'=0.93$).

Επίσης παρατηρείται επικράτηση των ομόζυγων ως προς το 251A αλληλόμορφο ατόμων στην ομάδα των non-ACS ασθενών εν συγκρίσει με την ομάδα των ACS ασθενών (OR=0.49, 95% CI: 0.24-1.0, $p=0.07$). Μία επικράτηση του AA₂₅₁TT₇₈₁ συνδυασμένου γονοτύπου παρατηρήθηκε επιπλέον στην ομάδα των non-ACS ασθενών (OR=0.43, 95% CI: 0.19-0.97, $p=0.04$).

Η συνολική εργασία καταλήγει στο συμπέρασμα ότι ο κοινός AA₂₅₁TT₇₈₁ γονότυπος σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο οξέος στεφανιαίου συνδρόμου σε διαγνωσμένους στεφανιαίους ασθενείς. Φάνηκε επίσης η συμμετοχή της IL-8 στις βιοχημικές διαδικασίες οι οποίες οδηγούν σε οξεία στεφανιαία σύνδρομα.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η συσχέτιση της παρουσίας των δυο αυτών πολυμορφισμών (-251 A/T και 781 C/T του εκκινητή του γονιδίου της IL-8) με την προδιάθεση για εμφάνιση επαναστένωσης μετά από Διαδερμική Ενδοστεφανιαία Παρέμβαση.

Συγκεκριμένα ελέγχθηκε η επικράτηση των παραπάνω SNP's σε 201 ασθενείς με ΣΝ οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε PCI και επανεμφάνισαν σημεία ισχαιμίας. Μετά από αγγειογραφικό επανέλεγχο, οι ασθενείς κατατάχθηκαν σε 2 υποομάδες ανάλογα με

την παρουσία ή μη επαναστένωσης ISR ($\geq 50\%$ μείωση της διαμέτρου του αγγείου κατά τον επανέλεγχο): 1) ISR group (n=73) και 2) non-ISR group (n=128).

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όσον αφορά τη συχνότητα των δύο υπό μελέτη πολυμορφισμών, ανάμεσα στις δύο υποομάδες. Παρ' όλα αυτά, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας του συνδεδεμένου γονοτύπου TT₂₅₁TT₇₈₁ στους ασθενείς με επαναστένωση, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η γενετική ποικιλότητα του γονιδίου της IL-8 επηρεάζει με κάποιον τρόπο την τάση προς επαναστένωση μετά από PCI.

Επιπλέον, στα πλαίσια του δευτέρου μέρους της Διδακτορικής Διατριβής, μελετήθηκε η έκφραση της IL-8 και των υποδοχέων αυτής, σε καλλιέργεια κυτταρικής σειράς μονοκυττάρων (THP-1). Η καλλιέργεια και επώαση των κυττάρων έγιναν σε θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από RPMI, HEPES, GLUTAMIN, FBS και αντιβιοτικά Πενικιλίνη και Στρεπτομυκίνη ενώ οι περισσότεροι χρόνοι επώασης αναφέρονται σε 24 ώρες. Μετά την 24ωρη επώαση και μετά την φυγοκέντρηση των καλλιεργειών για τη λήψη της κυτταρικής πελέτας, το υπερκείμενο υγρό διαχωρίζονταν και ψυχόταν στους -20°C , προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της έκφρασης IL-8 από τα κύτταρα.

Αρχικά, καλλιεργήθηκαν THP-1 κύτταρα υπό την επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων όπως λιποπολυσακχαρίτη (LPS), AngI και AngII και μετρήθηκε η έκφραση των υποδοχέων CXCR1 και CXCR2 της IL-8. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για διάστημα 24 και 72 ωρών και κατόπιν προσδιορίστηκε ποιοτικά και ποσοτικά η έκφραση των μελετώμενων υποδοχέων. Η μέτρηση των υποδοχέων έγινε με Κυτταρομετρία Ροής (FACS) κατόπιν σήμανσής τους με φθορίζοντα αντισώματα. Αυτό που παρατηρήθηκε κατά τη διαδικασία αυτή ήταν μικρή αύξηση των υποδοχέων της IL-8 κατά την επώαση (24 ώρες) των κυττάρων με LPS ενώ οι AngI και AngII δεν έδειξαν να προκαλούν σημαντική διαφοροποίηση στην έκφρασή τους. Σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ούτε στη δοκιμασία με επώαση 72 ωρών.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια αναστολής της δράσης του LPS με τη χρήση φαρμάκων και αντιφλεγμονοδών ουσιών. Χρησιμοποιήθηκαν, αρχικά, Καπτοπρίλη, Λισινοπρίλη και Λοζαρτάνη. Πρόκειται για 3 φάρμακα χρησιμοποιούμενα στην αντιμετώπιση της ΣΝ. Τα δύο πρώτα (Captopril, Lisinopril) αποτελούν Αναστολείς του Μετατρεπτικού Ενζύμου της Αγγιοτενσίνης (α -ΜΕΑ), ενώ η Losartan είναι Ανταγωνιστής του υποδοχέα για την AngII. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν, επώαση των THP-1 κυττάρων με LPS και ταυτόχρονα με LPS και κάθε μία από τις τρεις προαναφερθείσες ουσίες. Οι

δύο ΑΜΕΑ δεν έδειξαν να επηρεάζουν σημαντικά τα κύτταρα και την έκφραση των υποδοχέων. Αντίθετα, η Losartan προκάλεσε μια σταθερή, επαναλαμβανόμενη, σημαντική και δοσοεξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα CXCR1 και λιγότερο του CXCR2 μετά από 24 ώρες επώαση. Το αποτέλεσμα αυτό προκάλεσε την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της Λοζαρτάνης καθώς και άλλων φαρμάκων της ίδιας κατηγορίας στην έκφραση των μελετώμενων υποδοχέων καθώς βέβαια και της IL-8. Χρησιμοποιήθηκαν, για την πραγματοποίηση των ίδιων πειραμάτων, άλλα δύο φάρμακα της κατηγορίας των ανταγωνιστών του υποδοχέα της AngII, η Τελμιζαρτάνη και η Καντεζαρτάνη (Telmisartan- Candesartan) εκ των οποίων το πρώτο έδωσε αντίστοιχα με τη Losartan αποτελέσματα, ενώ, επώαση των κυττάρων με το δεύτερο δεν φάνηκε να επηρεάζει την έκφραση των υποδοχέων.

Κατόπιν, στις κυτταρικές καλλιέργειες προστέθηκαν για άλλη μια φορά οι φλεγμονώδεις ουσίες AngI και AngII προκειμένου να μελετηθεί η δράση τους σε συνδυασμό με τα υπό μελέτη φάρμακα. Παρατηρήθηκε μικρή μείωση της έκφρασης των υποδοχέων CXCR1 και CXCR2 κατά την επώαση των κυττάρων με AngII και Λοζαρτάνη, σε σύγκριση με την έκφρασή τους μετά από επώαση μόνο με Λοζαρτάνη ή Τελμιζαρτάνη. Δεν επαναλήφθηκε το ίδιο με την AngI ή με κάποια άλλη φαρμακευτική ουσία. Το γεγονός αυτό οδήγησε στη σκέψη πιθανής δράσης τόσο της AngII όσο και της Λοζαρτάνης σε κοινό υποδοχέα.

Επιπρόσθετα, έγινε και μέτρηση της έκφρασης της IL-8 υπό κάθε μία από τις παραπάνω συνθήκες, με τη μέθοδο ELISA. Στη φάση αυτή επιστρατεύτηκαν τα υπερκείμενα διαλύματα που είχαν φυλαχθεί ακριβώς για τον σκοπό αυτό. Η μέτρηση της έκφρασης της IL-8 σε υπερκείμενο κυτάρων καλλιεργημένων σε φλεγμονώδεις συνθήκες καθώς και σε συνθήκες επίδρασης με φάρμακα, έδειξε σημαντική αύξηση της έκφρασης της IL-8 υπό την επίδραση και των τριών φλεγμονωδών ουσιών (LPS, AngI και AngII) και αντίστοιχη μείωση των τιμών αυτών κατά την προσπάθεια αναστολής της φλεγμονής με τα χρησιμοποιούμενα φάρμακα. Επιπλέον διαφάνηκε και πάλι η τάση για αναστολή της δράσης της Λοζαρτάνης από την παρουσία της AngII.

Τα παραπάνω πειράματα σκιαγραφούν πιθανούς γενετικούς και κυτταρικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων μια φλεγμονώδης ουσία (IL-8) μπορεί να επηρεάσει και να επηρεαστεί κατά τη διάρκεια της πολύπλοκης διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης.

SUMMARY

Atherosclerosis is a complicated multivariate disease of medium and large arteries, which leads to progressive accumulation of smooth muscle cells, fat and connective tissue in the vascular intima and is also connected with a lot of environmental risk factors interacting with the individuals genetic background.

Growing evidence is obtained on the inflammatory nature of atherosclerosis.

Several proinflammatory factors, chemoattractant cytokines (chemokines), binding molecules play an important role in orchestrating the overall procedure. In modern bibliography there is an increasing interest on the chemokines role in the atherosclerosis, because of their involvement in important aspects of atherogenesis, such as recruitment of inflammatory cells in vascular wall and proliferation of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques.

Interleukin 8 (IL-8), the standard chemokine of CXC subgroup appears to be involved in vascular pathology. Based on literature data, specific polymorphisms of the chemokine CXCL8 (IL-8) genes and its receptors are involved in the clinical manifestation of other diseases such as bronchial asthma, multiple sclerosis and RSV infection.

In this context two of the five known polymorphisms were examined, the -251 A / T and 781 C / T of the promoter of the IL-8 gene and their frequency in relation to the existence or absence of coronary disease.

For this purpose blood samples were collected from 300 CAD patients and 189 healthy controls. All the survey subjects were selected after undergoing Percutaneous Coronary Intervention (PCI). The DNA samples were divided in homozygous and heterozygous as for the studied polymorphism. Additionally there was also confirmation of the existence and position of the polymorphism -251 A/T by Sequencing.

In the process of genotypic-phenotypic correlation 241 patients and 157 controls were included. In the same population was also recorded the clinical establishment of coronary heart disease (stable-unstable angina, acute myocardial infarction). This way it became possible the further division of the members of patients group in two subgroups: a) Patients with Acute Coronary Syndrome (ACS group, n = 121) and b) Patients with stable disease (non ACS group, n = 120). The analysis showed a strong association between the two loci ($D' = 0.93$).

Also a predominance of homozygous was observed as for the 251A allele in the group of the non-ACS patients compared with the group of ACS patients (OR = 0.49, 95% CI: 0.24-1.0, $p = 0.07$). A predominance of AA251TT781 combined genotype was also observed to the group of non-ACS patients (OR = 0.43, 95% CI: 0.19-0.97, $p = 0.04$).

The overall work leads to the conclusion that the common AA251TT781 genotype is related with reduced risk of acute coronary syndrome in diagnosed coronary patients. It was also revealed the involvement of IL-8 in the biochemical processes leading to acute coronary syndromes.

Then we examined the correlation of the presence of these two polymorphisms (-251A/T and 781C/T of the promoter of the gene IL-8) with the predisposition for restenosis appearance after PCI. More specifically the prevalence of these SNP's was tested in 201 patients with CAD who had undergone PCI and they had shown signs of recurrent ischemia.

After angiographic re-examination, patients were divided into 2 subgroups according to the presence or absence of restenosis ISR ($\geq 50\%$ reduction in vessel diameter during retesting): 1) ISR group (n = 73) and 2) non-ISR group (n = 128). No statistically significant differences in the frequency of two studied polymorphisms were found between the two subgroups.

Nevertheless, a statistically significant increase of the frequency of the connected TT₂₅₁TT₇₈₁ genotype was found in patients with restenosis, which suggests that the

genetic diversity of the IL-8 gene in some way affects the tendency to restenosis after PCI.

Moreover, during the second part of the PhD, we studied the expression of the IL-8 and the receptors of it, in cultivation of human monocyte cell line (THP-1). The cultivation and incubation of the cells proceeded in a nutrient medium consisting of RPMI, HEPES, GLUTAMIN, FBS and antibiotics penicillin and streptomycin while most incubation times refer to 24 hours. After the 24hours incubation and after centrifugation of cultivations for taking the cell pellets, the supernatant liquid was separated and cooled to -20 °C, in order to be used in measurement of IL-8 expression of the cells.

Initially, THP-1 cells were cultivated under the influence of inflammatory factors such as lipopolysaccharide (LPS), AngI and AngII and the expression of the receptors CXCR1 and CXCR2 in IL-8 was measured. The incubation lasted for 24 or 72 hours and then the expression of the studied receptors was qualitatively and quantitatively determined. The receptors were measured by flow cytometry (FACS) after their labeling with fluorescent antibodies. What was observed during this procedure was slight increase of the IL-8 receptors during the incubation (24 hours) of the cells with LPS while AngI and AngII didn't seem to cause significant difference in their expression. No significant difference was either observed after 72 hours incubation.

Thereafter, an attempt was made to suspend the action of LPS using medicines and anti-inflammatory substances. Initially, Captopril, Lisinopril and Losartan were used. These are 3 drugs used to treat CAD.

The first two (Captopril, Lisinopril) are inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE), while Losartan is an antagonist of the receptor for AngII. There was then, incubation of THP-1 cells with LPS and simultaneously with LPS and each of the above three substances. The two inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE) didn't show any significant effect on the cells and the expression of the receptors. In contrast, Losartan caused a consistent, repeatable, and significant dose-dependent

increase of the expression of the receptor CXCR1 and CXCR2 (less than the first one) after 24 hours incubation. This result led to a need of further investigation for the effect of Losartan and other medicines of the same class in the expression of the studied receptors and of course of IL-8.

This time two new medicines of the same class (antagonists of the receptor for AngII) were used for the same experiments, Telmisartan and Candesartan. Telmisartan gave the similar results as Losartan while incubation in Candesartan didn't seem to influence the expression of the receptors.

Subsequently, in the cell cultivation the inflammatory substances AngI and AngII were added in order to reveal their action in combination with the under study medicines. Slight decrease in expression of receptors CXCR1 and CXCR2 during incubation of cells with AngII and Losartan was observed, compared with their expression after incubation only with Losartan or Telmisartan. The result did not come up the same as with AngI or any other medical substance. This fact led to the probability of AngII and Losartan action on a common receptor.

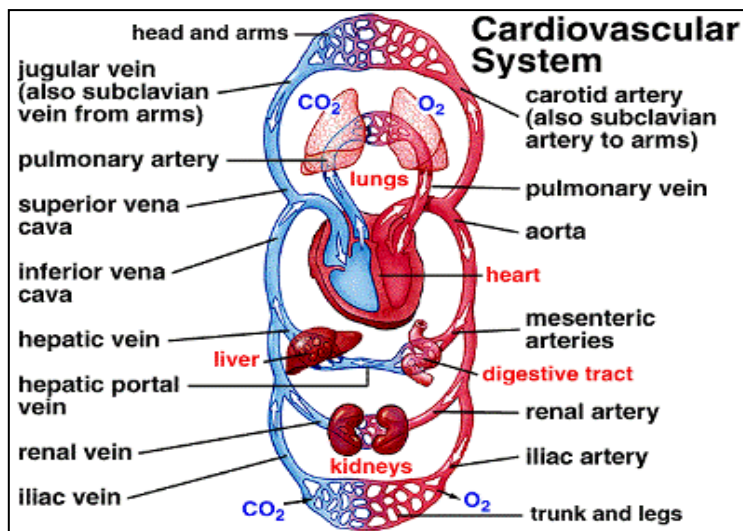
In addition, the expression of IL-8 was measured under anyone of the above conditions, with the ELISA method.

There, the supernatants which were kept for this purpose were used. The measurement of the IL-8 expression in supernatants of cultivated cells in inflammatory conditions and in under medicine influence conditions, revealed significantly increased expression of IL-8 under the influence of all three inflammatory substances (LPS, AngI and AngII) and a corresponding reduction of these rates during the attempt to inhibit the inflammation with the medicines used. Additionally there showed a tendency towards inhibition of Losartan's action by the presence of AngII. These experiments illustrate potential genetic and cellular mechanisms through which an inflammatory substance (IL-8) can affect and be affected during the complex process of atherosclerosis.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ

Η ανθρώπινη καρδιά έχει μόλις το μέγεθος μιας γροθιάς αλλά είναι ο ισχυρότερος μυς του ανθρωπίνου σώματος. Η καρδιά αρχίζει να χτυπά κατά την εμβρυϊκή ζωή, περίπου 21 με 28 ημέρες μετά τη σύλληψη. Μία καρδιά χτυπά κατά μέσο όρο 100.000 φορές την ημέρα και περισσότερες από 2,5 δισεκατομμύρια φορές κατά τη διάρκεια μιας ζωής περίπου 70 ετών. Με κάθε χτύπο, η καρδιά αντλεί αίμα από και προς όλο το σώμα. Σε φυσιολογικές συνθήκες η καρδιά χτυπά 70 φορές το λεπτό, αλλά αυτός ο ρυθμός μεταβάλλεται σε συνθήκες άσκησης ή σε στιγμές έντονης συναισθηματικής φόρτισης.



Εικόνα 1

Το αίμα ωθείται προς τα έξω από τις αριστερές καρδιακές κοιλότητες και μεταφέρεται μέσω του αρτηριακού δικτύου (αορτή- αρτηρίες- αρτηρίδια- τριχοειδή) στους ιστούς του ανθρωπίνου σώματος. Αφού, τα μεταφερόμενα από το αίμα οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες, αποδοθούν στους ιστούς ενώ άχρηστα προϊόντα μεταβολισμού παραληφθούν από τους ιστούς, το αίμα επιστρέφει μέσω του φλεβικού δικτύου (τριχοειδή- φλεβίδια- φλέβες- άνω και κάτω κοίλη φλέβα) στις δεξιές καρδιακές

κοιλότητες (εικ. 1). Είναι αυτονόητο πως αυτό το τόσο αναπτυξιακά εκλεπτυσμένο λειτουργικό σύστημα είναι ιδιαίτερος ευάλωτο σε φθορές και βλάβες προκαλούμενες από ποικίλους παράγοντες κινδύνου.

ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Αγγειακό Εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ): Προκαλείται από διακοπή της αιματικής ροής στον εγκέφαλο, είτε λόγω κωλύματος (ισχαιμικό ΑΕΕ) είτε λόγω ρήξης (αιμορραγικό ΑΕΕ) αιμοφόρου αγγείου.

Στεφανιαία νόσος: ο πιο συχνός τύπος καρδιαγγειακής νόσου. Αναλύεται εκτενώς παρακάτω.

Ρευματική νόσος: βλάβη στο μυοκάρδιο και τις καρδιακές βαλβίδες εξαιτίας ρευματικού πυρετού (λοίμωξη από στρεπτοκοκκικά βακτήρια).

Συγγενείς καρδιακές νόσοι: δυσπλασίες των καρδιακών δομών (ελλείμματα στα τοιχώματα της καρδιάς, παθολογικές βαλβίδες και παθολογικές καρδιακές κοιλότητες) υφιστάμενες κατά τη γέννηση, οι οποίες προκαλούνται είτε από γενετικούς παράγοντες είτε από επικράτηση αντίξωων συνθηκών κατά τη διάρκεια της κύησης.

Ανεύρυσμα και διαχωριστικό ανεύρυσμα αορτής: Διάταση και ρήξη της αορτής εξαιτίας γενετικών και επίκτητων παραγόντων.

Περιφερική αγγειοπάθεια: εκφυλιστική ή αποφρακτική νόσος των περιφερικών αγγείων σε άνω και κάτω άκρα.

Εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (DVT) και πνευμονική εμβολή: σχηματισμός θρόμβων αίματος στο φλεβικό δίκτυο των κάτω άκρων (DVT) οι οποίοι μπορεί να αποκολληθούν και να μεταφερθούν με την κυκλοφορία του αίματος στην καρδιά και τους πνεύμονες.

Λιγότερο συχνοί τύποι καρδιαγγειακής νόσου: όγκοι καρδιάς, αγγειακοί όγκοι εγκεφάλου, δυσλειτουργία του καρδιακού μυός (μυοκαρδιοπάθειες), δυσλειτουργία των καρδιακών βαλβίδων [1].

ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η Στεφανιαία Νόσος είναι μία σχετικά «νεαρή» νόσος στα παγκόσμια χρονικά. Μετά το 1990, περισσότεροι άνθρωποι έχουν πεθάνει από Στεφανιαία Νόσο σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη αιτία θανάτου. Υπάρχουν διαφορές στη θνησιμότητα μεταξύ των πληθυσμών. Φαίνεται μάλιστα πως η θνησιμότητα από ΣΝ είναι χαμηλότερη σε πληθυσμούς με χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης. Η θνησιμότητα από ΣΝ επηρεάζεται επίσης από τις εθνικές διαφορές στους επιμέρους κύριους παράγοντες κινδύνου, όπως η Αρτηριακή Υπέρταση, η Υπερλιπιδαιμία, το κάπνισμα, η φυσική δραστηριότητα και η διαίτα. Παρ' ότι η γενετική προδιάθεση παίζει το ρόλο της, το 80-90% των ανθρώπων που πεθαίνουν από ΣΝ, έχουν ένα ή περισσότερους από τους παραπάνω παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι όπως είναι φανερό επηρεάζονται άμεσα από τον τρόπο ζωής. Το ανησυχητικό τελικό αποτέλεσμα όμως είναι πως κάθε χρόνο πεθαίνουν 3,8 εκατομμύρια άντρες και 3,2 εκατομμύρια γυναίκες από ΣΝ.

Τα ποσοστά θανάτων από ΣΝ παρουσιάζουν μείωση στη Β. Αμερική και τις χώρες της Δυτικής Ευρώπης. Η μείωση αυτή δεν μπορεί παρά να αποδοθεί στη βελτίωση των μεθόδων πρόληψης, διάγνωσης και αντιμετώπισης, ιδιαιτέρως στη μείωση του καπνίσματος, στα χαμηλότερα επίπεδα Αρτηριακής Πίεσης και Χοληστερόλης αίματος[1].

Όσον αφορά την Ελλάδα, η μελέτη ΑΤΤΙΚΗ της Α' Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών έδειξε ότι η 5ετής επίπτωση της καρδιαγγειακής νόσου ήταν 11% για τους άνδρες και 6% για τις γυναίκες, δηλαδή 90.000 άνδρες και 49.500 γυναίκες αναμένεται να εκδηλώσουν καρδιαγγειακό επεισόδιο. Από τη μελέτη GREECS φάνηκε επίσης ότι ανά 100.000 άτομα αντιστοιχούν 226 εισαγωγές κάθε χρόνο σε Νοσοκομείο λόγω οξέος στεφανιαίου επεισοδίου.

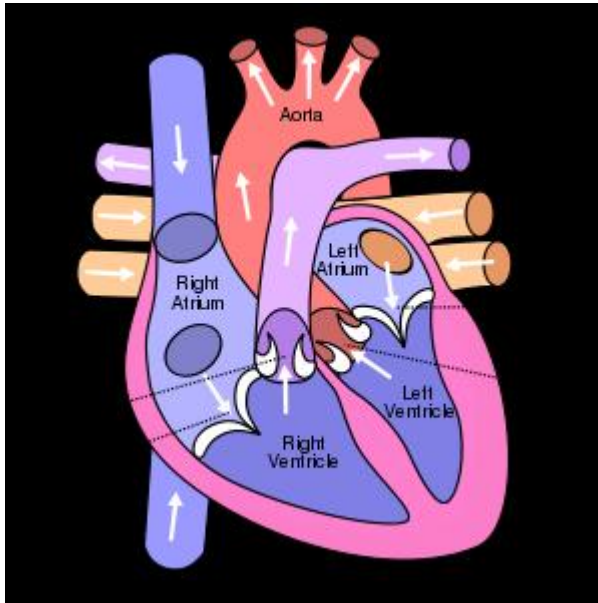
Δυστυχώς, στο μέλλον αναμένεται αύξηση κατά 82% στη θνησιμότητα από ΣΝ, και αναμένεται βεβαίως στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Μεταξύ των ασθενών που χάνουν τη ζωή τους τις πρώτες 28 ημέρες από την έναρξη των συμπτωμάτων, το 1/3 πεθαίνει πριν καν φτάσει στο Νοσοκομείο! Το γεγονός αυτό, όχι μόνο τονίζει την ανάγκη έγκαιρης αναγνώρισης των συμπτωμάτων, αλλά καθιστά και επιτακτική την ανάγκη για πρόληψη.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ- ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Καρδιά

Η καρδιά είναι ένα κοίλο όργανο χωριζόμενο από ένα μυώδες διάφραγμα σε δύο επιμέρους χώρους (αριστερή και δεξιά καρδιά). Κάθε ένας από τους χώρους αυτούς διαμερισματοποιείται περαιτέρω σε δύο κοιλότητες με την παρέμβαση ενός εγκαρσίου διαφράγματος (κόλπος και κοιλία). Η επικοινωνία μεταξύ κόλπου και κοιλίας επιτυγχάνεται μέσω των κολποκοιλιακών βαλβίδων οι οποίες είναι η μιτροειδής βαλβίδα (διγλώχινα) για τις αριστερές κοιλότητες και η τριγλώχινα βαλβίδα για τις δεξιές κοιλότητες. Οι χώροι της δεξιάς και της αριστερής καρδιάς φυσιολογικά δεν επικοινωνούν μεταξύ τους, αντίθετα διαχωρίζονται στεγανά από το μεσοκολπικό και το μεσοκοιλιακό διάφραγμα. Στην καρδιά εντοπίζονται άλλες δύο βαλβίδες, η μία στο σημείο εξόδου του αίματος από τη δεξιά κοιλία προς την πνευμονική κυκλοφορία (πνευμονική βαλβίδα) και η άλλη στο αντίστοιχο σημείο εξόδου του αίματος από την αριστερή κοιλία προς την αορτή και τη συστηματική κυκλοφορία (αορτική βαλβίδα) (εικ. 2). Η καρδιά μαζί με μέρος των εκφυόμενων από αυτήν μεγάλων αγγείων περιέχεται σε ένα διπέταλο σάκο μεσοδερματικής προελεύσεως, το περικάρδιο. Το ένα πέταλο του περικαρδίου έρχεται σε άμεση επαφή με το μυοκάρδιο (περισπλάχνιο πέταλο ή επικάρδιο) ενώ το άλλο αποτελεί έναν εξωτερικό ινώδη υμένα (τοιχωματικό περικάρδιο). Μεταξύ των δύο πετάλων περιέχεται φυσιολογικά μικρή ποσότητα περικαρδιακού υγρού.



Εικόνα 2

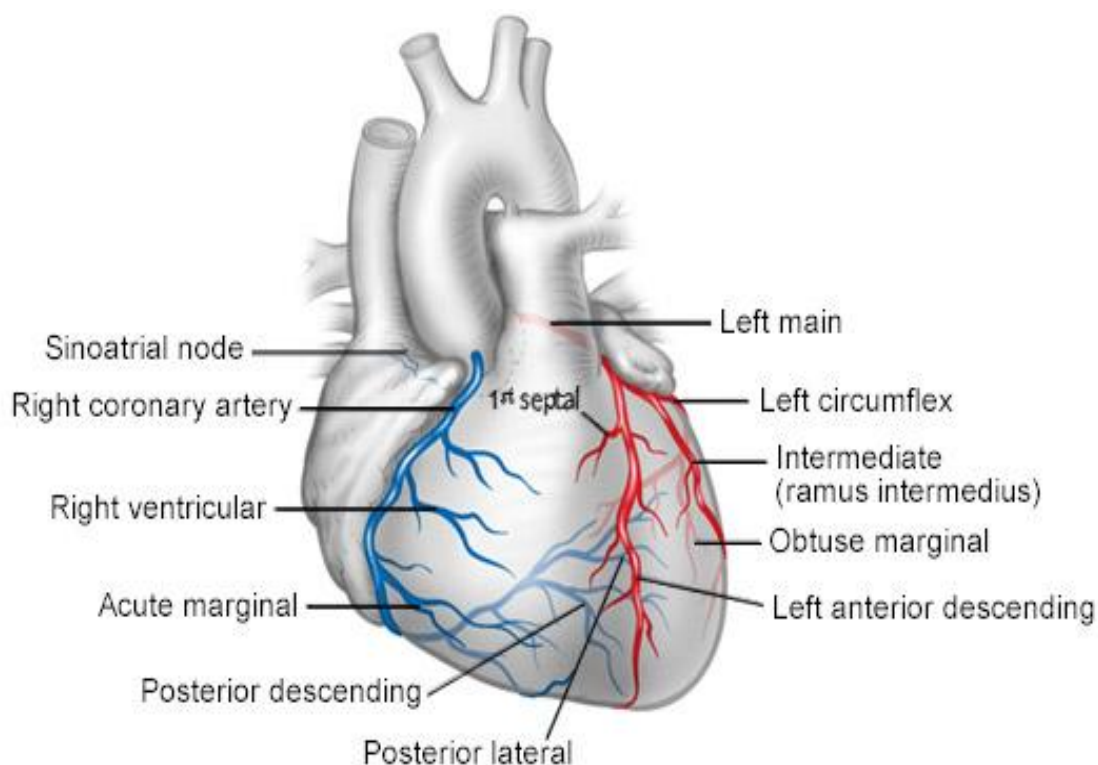
Οι κοιλίες είναι οι κύριες κοιλότητες άντλησης ενώ οι κόλποι αποτελούν βοηθητικές αντλίες συντελώντας στην ολοκλήρωση της πλήρωσης των κοιλιών. Το αίμα σε κάθε συστολή ωθείται προς τη συστηματική κυκλοφορία από την αριστερή κοιλία δια μέσου της αορτικής βαλβίδας στην αορτή και κατόπιν στα προοδευτικά μειούμενης διαμέτρου αγγεία. Από την περιφέρεια, το φλεβικό αίμα επιστρέφει μέσω αγγείων προοδευτικά αυξανόμενης διαμέτρου, προς την άνω και κάτω κοίλη φλέβα για να καταλήξει στο δεξιό κόλπο και δια μέσου της τριγλώχινας στη δεξιά κοιλία κατά τη διάρκεια της διαστολής. Από τη δεξιά κοιλία το αίμα ωθείται προς την πνευμονική κυκλοφορία με την πνευμονική αρτηρία δια της πνευμονικής βαλβίδας κι επιστρέφει από τη «μικρή» κυκλοφορία δια των πνευμονικών φλεβών στον αριστερό κόλπο και μέσω της μιτροειδούς στην αριστερή κοιλία.

Η συστολή των καρδιακών κοιλοτήτων συντονίζεται από σημεία του μυοκαρδίου που αποτελούνται από μυοκύτταρα με εξειδικευμένες ιδιότητες αυτοματισμού (βηματοδότες) και αγωγιμότητας. Φυσιολογικά, τα προεξάρχοντα σημεία είναι δύο και ονομάζονται φλεβόκομβος και κολποκοιλιακός κόμβος. Ο φλεβόκομβος έχει την υψηλότερη συχνότητα βηματοδότησης (60-100 παλμοί/ λεπτό) και αποτελεί τη θέση παραγωγής του αρχικού ηλεκτρικού ερεθίσματος, το οποίο ακολούθως διαδίδεται στο

μυοκάρδιο των κόλπων και προκαλεί τη συστολή τους για να καταλήξει στον κολποκοιλιακό κόμβο. Εκεί η ταχύτητα αγωγής του ερεθίσματος μειώνεται από 1 σε 0.05 m/sec. Το ηλεκτρικό ερέθισμα, στη συνέχεια άγεται ταχύτατα κατά μήκος του δεματίου του His και των ινών Purkinje για να εκπολώσει τα μυοκαρδιακά κύτταρα των κοιλιών και να προκαλέσει τη συστολή τους.

Στεφανιαίο δίκτυο

Η αγγείωση του μυοκαρδίου γίνεται μέσω των στεφανιαίων αγγείων. Η αριστερή και η δεξιά στεφανιαία αρτηρία εκφύονται από τη ρίζα της αορτής όπως φαίνεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3

Η μεγάλη αριστερή στεφανιαία αρτηρία διαιρείται στην αριστερή πρόσθια κατιούσα αρτηρία και στην περισπώμενη στεφανιαία αρτηρία. Η αριστερή πρόσθια κατιούσα χωρίζεται περαιτέρω σε διαγώνιους και διαφραγματικούς κλάδους οι οποίοι αιματώνουν το πρόσθιο τοίχωμα και το διάφραγμα της καρδιάς αντίστοιχα. Η

περισπώμενη στεφανιαία αρτηρία φέρεται προς τα πίσω δια της αριστερής κολποκοιλιακής αύλακας και χωρίζεται στις μεγάλες αμβλείες επιχείλιες αρτηρίες που αιματώνουν το ελεύθερο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας. Η δεξιά στεφανιαία αρτηρία φέρεται δια της δεξιάς κολποκοιλιακής αύλακας και αιματώνει τη δεξιά κοιλία με τους οξείς επιχείλιους κλάδους αυτής. Η οπίσθια κατιούσα αρτηρία, που αιματώνει το οπίσθιο και το κατώτερο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας, εκφύεται από τη δεξιά στεφανιαία αρτηρία στο 80% των ατόμων (δεξιά επικρατούσα κυκλοφορία) και από την περισπώμενη αρτηρία στο υπόλοιπο 20% (αριστερά επικρατούσα κυκλοφορία) [2].

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ

Αν και το μυοκάρδιο αντιστοιχεί μόλις στο 0.3% του σωματικού βάρους, απαιτεί το 7% του οξυγόνου που καταναλώνεται κατά την ηρεμία. Μείωση της παροχής οξυγόνου στο μυοκάρδιο προκαλεί ισχαιμία και νόσο (Στεφανιαία Νόσος- ΣΝ) εκδηλούμενη ποικιλοτρόπως ανάλογα με την έκταση και τη διάρκεια της ισχαιμίας.

Ισχαιμία (κυτταρική εξάντληση και θάνατος οφειλόμενος σε έλλειψη οξυγόνου) του μυοκαρδίου μπορεί να προκύψει είτε λόγω αυξημένων αναγκών του μυοκαρδίου σε οξυγόνωση (π.χ. θυρεοτοξίκωση- ταχυκαρδία) είτε λόγω μειωμένης παροχής οξυγόνου από μείωση της διαμέτρου των στεφανιαίων αγγείων. Το κυριότερο παθοφυσιολογικό υπόβαθρο της στένωσης των στεφανιαίων αγγείων αποτελεί η αθηροσκλήρωση. Ανάλογα με τη διάρκεια , την έκταση και τη θέση της αποφρακτικής βλάβης, η στεφανιαία νόσος παρουσιάζεται με διαφορετικά κλινικά σύνδρομα. Τα τελευταία διακρίνονται στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα: Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου (OEM) – *myocardial infarction* ή *heart attack* – και ασταθής στηθάγχη – *unstable angina* – , και τα μη οξέα στεφανιαία σύνδρομα με κυριότερο εκπρόσωπο τη σταθερή στηθάγχη – *stable angina* –. Το OEM προκύπτει από μη αναστρέψιμη βλάβη (θάνατο) μυοκαρδιακών κυττάρων και σχηματισμό ουλής. Με την πρόοδο του χρόνου το ουλοποιημένο μυοκάρδιο οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια και θάνατο. Η

παροδική ισχαιμία του μυοκαρδίου εμφανίζεται με τη μορφή του στηθαγχικού άλγους το οποίο υφύεται με τη χορήγηση νιτρωδών φαρμάκων ή με την άρση του πυροδοτικού αιτιολογικού παράγοντα (σωματική κόπωση, βαρύ γεύμα, συναισθηματική φόρτιση κ.α.). Επίσης η χρόνια υψηλού βαθμού στένωση των στεφανιαίων αγγείων μπορεί να οδηγήσει σε παροδική ισχαιμία των βηματοδοτικών καρδιακών κέντρων, πρόκληση αρρυθμίας στους κόλπους, επέκταση σε κοιλιακή αρρυθμία και θάνατο [3].

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Το 75% των κρουσμάτων καρδιαγγειακής νόσου αποδίδεται στην ύπαρξη των συμβατικών παραγόντων κινδύνου.

- Κύριοι τροποποιούμενοι παράγοντες κινδύνου:

Υψηλή Αρτηριακή Πίεση, Δυσλιπιδαιμία, Κάπνισμα, Σακχαρώδης Διαβήτης, έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, παχυσαρκία, διαιτολόγιο φτωχό σε φρούτα και λαχανικά.

- Δευτερεύοντες τροποποιούμενοι παράγοντες κινδύνου:

Χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση, πνευματική- ψυχική νόσος (π.χ. κατάθλιψη), ψυχοκοινωνικό στρες, χρήση αλκοόλ, χρήση συγκεκριμένων φαρμάκων (π.χ. αντισυλληπτικά), αυξημένα επίπεδα α- λιποπρωτεΐνης, υπερτροφία αριστεράς κοιλίας.

- Μη τροποποιούμενοι παράγοντες κινδύνου:

Ηλικία, κληρονομικό ιστορικό, φύλλο, εθνικότητα ή φυλή.

- Νεοεμφανιζόμενοι παράγοντες κινδύνου:

Αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα, φλεγμονή, αυξημένη πηκτικότητα αίματος [1].

ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

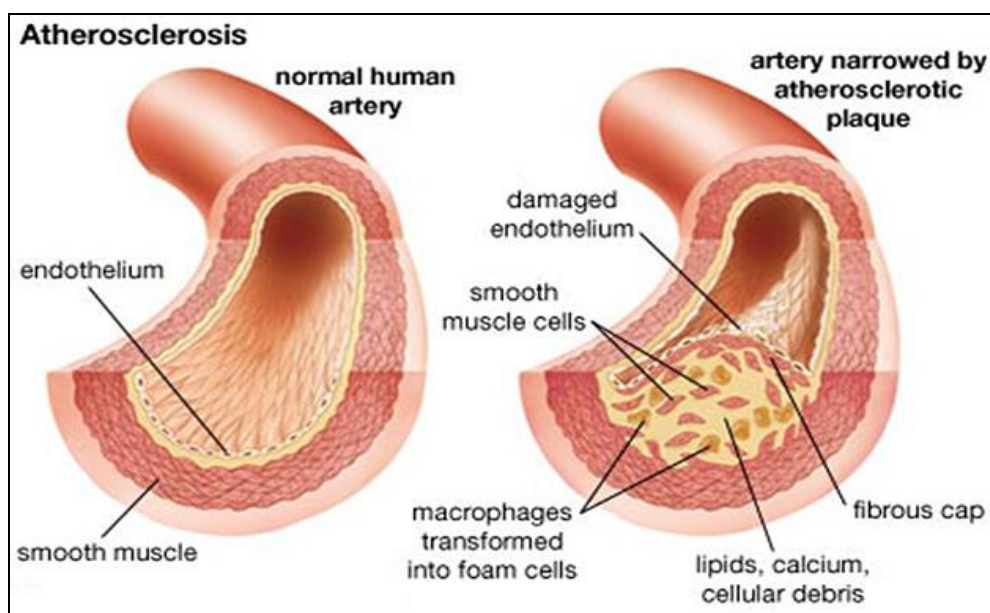
Παθολογοανατομικό υπόστρωμα

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί νόσο των μεσαίου και μεγάλου μεγέθους αγγείων και θεωρείται τα τελευταία χρόνια πως περιλαμβάνει φλεγμονώδεις αλληλουχίες υποκινούμενες από ένα πολυπαραγοντικό σύνολο ερεθισμάτων.

Η αθηρωματική πλάκα σχηματίζεται από τη σύμπλοκη εναπόθεση κυττάρων κι εξωκυττάρων ουσιών στον έσω αγγειακό χιτώνα (Εικόνα 4). Οι αθηρωματικές πλάκες χαρακτηρίζονται από διάφορες μορφές και στάδια εξέλιξης.

Οι πρώιμες βλάβες χαρακτηρίζονται από τη διήθηση αφρώδων κυττάρων, τα οποία είναι μακροφάγα που περιέχουν προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων και εστέρες χοληστερόλης (βλάβες τύπου I). Οι βλάβες αυτές καθώς ωριμάζουν διηθούνται από λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs) και άλλα λιπίδια, ενώ τα αφρώδη κύτταρα αυξάνουν και οργανώνονται σε στοιβάδες (βλάβες τύπου II ή λιπώδεις γραμμώσεις). Στη συνέχεια επέρχεται εναπόθεση συνδετικού ιστού και συσσώρευση εξωκυττάρων μικροσταγονιδίων λιπιδίων (βλάβη τύπου III ή προαθήρωμα). Οι πρώιμες αυτές βλάβες αναπτύσσονται συνήθως κατά τις 3 πρώτες δεκαετίες της ζωής κυρίως σε σημεία των στεφανιαίων αγγείων με τοπική στροβιλώδη ροή. Η βλάβη τύπου IV ή αθήρωμα προκύπτει από τη συνεχή εισροή λιπιδίων δια του αγγειακού τοιχώματος, την αύξηση των υπενδοθηλιακών λιπιδίων και τη σύντηξη τους προς εκείνο το σχηματισμό που καλείται «λιπώδης πυρήνας». Σ' αυτή τη φάση η αθηρωματική βλάβη περιέχει μεγάλη ποσότητα εξωκυττάρων λιπιδίων και καταλαμβάνει μια εκτεταμένη, αλλά καλώς περιγεγραμμένη περιοχή του έσω αγγειακού χιτώνα. Πρόκειται πλέον για μία βλάβη που θεωρείται προχωρημένη, λόγω της σημαντικής αποδιοργάνωσης που επιφέρει ο λιπώδης πυρήνας στη δομή του έσω χιτώνα. Συχνά το αθήρωμα δεν προκαλεί στένωση του αυλού του αγγείου, αλλά μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των εξωτερικών ορίων του (θετική αναδιαμόρφωση). Όταν επέλθει αύξηση της εναπόθεσης ινιδίων κολλαγόνου και σχηματισμός στοιβάδας

ινώδους ιστού στα όρια του λιπώδους πυρήνα (ινώδης κάψα), η βλάβη χαρακτηρίζεται ως τύπου V ή ινοαθήρωμα. Οι βλάβες τύπου V υποδιαιρούνται σε βλάβες τύπου Va (η ινώδης κάψα περιβάλλει έναν σαφώς αφορισμένο λιπώδη πυρήνα), Vb (ασβέστωση λιπώδους πυρήνα ή άλλων σημείων της βλάβης) και Vc (μερική ή ολική απόκρυψη λιπώδους πυρήνα από την ασβέστωση). Αυτές οι βλάβες προκαλούν διάφορου μεγέθους στενώσεις στον αυλό των αγγείων. Επειδή η περιοχή μεταξύ του λιπώδη πυρήνα και του έσω αγγειακού χιτώνα περιέχει άφθονες πρωτεογλυκάνες, πολλά αφρώδη κύτταρα και λίγα μόνο μεμονωμένα SMCs με ελάχιστο κολλαγόνο, η βλάβη αυτή συχνά οδηγεί σε διάρρηξη του έσω χιτώνα και σε σχηματισμό ρωγμών και εξελκώσεων (βλάβη τύπου VI). Ιδιαίτερα ευάλωτες σε ρήξη είναι οι περιφερικές περιοχές των βλαβών τύπου VI. Όταν υπάρχει μόνο απλή λύση της συνέχειας του έσω χιτώνα μιλάμε για βλάβη τύπου VIa, όταν συνυπάρχει αιμάτωμα ή αιμορραγία για βλάβη τύπου VIb, και με την παρουσία θρόμβου για βλάβη τύπου VIc. Την περαιτέρω τύχη της αθηρωματικής πλάκας, τη σταθερότητά της ή τη ρήξη της καθώς και το βαθμό στον οποίο αυτή θα προκαλέσει στένωση του αγγείου, θα την καθορίσουν πολυπαραγοντικές και πολύπλοκες διεργασίες φλεγμονώδους απόκρισης στην ενδοθηλιακή βλάβη [2].



Εικόνα 4

Αθηροσκλήρωση και φλεγμονή

Ένα από τα πιο πρώιμα γεγονότα στο μοντέλο που υποστηρίζει το φλεγμονώδη χαρακτήρα της αθηροσκλήρωσης είναι η πρόσδεση των λευκοκυττάρων στο δυσλειτουργικό ενδοθήλιο (συνήθως έχει προηγηθεί μικροτραυματισμός από στροβιλώδη αιματική ροή και διαταραχή της συνέχειάς του). Κατά την εξέλιξη της βλάβης παρατηρείται η συσσώρευση ποικίλων κυττάρων. Φαίνεται πως τα μακροφάγα συγκεντρώνουν τα κυτταρικά συστατικά του φλεγμαίνοντος ενδοθηλίου. Παρ' όλα αυτά, σε αρκετά πειραματικά μοντέλα έχει δειχθεί άμεσα και η συμμετοχή λεμφοκυττάρων και σε μικρότερο βαθμό μαστοκυττάρων, δενδριτικών και πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων στη δημιουργία της αθηρωματικής βλάβης [5]. Παρά το γεγονός ότι τα ερεθίσματα είναι ποικίλα, η συσσώρευση των λιπιδίων είναι μακράν η προεξάρχουσα διαδικασία κατά την πειραματική αναπαράσταση της αθηροσκληρωτικής διεργασίας. Η εξοκυστική συγκέντρωση λιπιδίων συμβαίνει νωρίς ως ανταπόκριση στα υψηλά επίπεδα λιποπρωτεΐνης στο αίμα. Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας- LDL- μετατρέπονται άμεσα στον υπενδοθηλιακό χώρο αρχικά σε ελάχιστα τροποποιημένες LDL και εν συνεχεία σε οξειδωμένες LDL (oxLDL)[6]. Παρ' ότι στην oxLDL έχουν αποδοθεί και άμεσες χημοτακτικές ιδιότητες [7,8], η συγκέντρωσή της στον έσω χιτώνα των αγγείων προωθεί τη διαπίδυση των φλεγμονωδών κυττάρων κυρίως λόγω πρόκλησης της δράσης των χημοκινών [6,9]. Κάθε στάδιο της αθηροσκλήρωσης ρυθμίζεται από συγκεκριμένο σύμπλοκο χημοκίνης συνδέτη/ υποδοχέα το οποίο χαρακτηριστικά περιγράφεται ως «δομή περιτέχνου και εξειδικευμένου καταμερισμού εργασίας» (Zernecke et al.) [10]. Στα αρχικά στάδια της αθηρογένεσης η oxLDL προκαλεί την έκφραση των χημοτακτικών για τα μονοκύτταρα πρωτεϊνών (MCP)-1, FKN και GRO-α από τα SMCs και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs). Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια δρουν πιθανώς ως εναλλακτικές πηγές χημοκινών με την εναπόθεση RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and Secreted) και παράγοντα αιμοπεταλίων 4 στις πρώιμες αθηροσκληρωτικές βλάβες του ενδοθηλίου[11,12]. Η

αλληλεπίδραση FKN και GRO-a και RANTES με τους υποδοχείς CX3CR1, CXCR2 και CCR1 αντίστοιχα, θεωρείται πως αποτελεί πρώιμο μονοπάτι για τη σταθερή προσκόλληση των κυλιόμενων μονοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο [11-13]. Το GRO-a σταθεροποιείται στην επιφάνεια των ECs με τη δράση των ηπαρινικών πρωτεογλυκανών και προκαλεί τη μόνιμη σύνδεση των μονοκυττάρων που εκφράζουν CXCR2, ενώ η FKN ως δομικά μοναδική χημοκίνη συγχωνεύεται με μία διαμεμβρανική βλεννοπρωτεΐνη και δρα ως μηχανισμός ανεξάρτητος από την ιντεγκρίνη [14]. Η MCP-1 οδηγεί περαιτέρω τη διαδικασία: Η εκκρινόμενη από τα ECs και τα SMCs διαλυτή MCP-1 προωθεί δομικές αλλαγές στον κυτταροσκελετό των μονοκυττάρων που εκκρίνουν CCR2 καθιστώντας δυνατή την διαενδοθηλιακή μετανάστευσή τους [11-13]. Στη συνέχεια με την επίδραση της IFN- γ , οι χημοκίνες της ομάδας CXC και τα επηρεαζόμενα από την IFN- γ πρωτεΐνη 10, μονοκίνη και χημειοτακτικός παράγοντας α για τα T- κύτταρα εκφράζονται στα ECs και αλληλεπιδρούν με τα T- κύτταρα που εκφράζουν CXCR3. Έτσι εκκινείται η ραγδαία και ανθεκτική στο διαχωρισμό σύνδεση των κυττάρων ενισχύοντας την αγγειακή φλεγμονώδη ανταπόκριση [11-13, 15]. Η ομοίωση του περιφερικού αίματος και η παλιννόστηση των ουδετερόφιλων και των πρόδρομων αγγειακών κυττάρων, όσον αφορά την αθηροσκλήρωση, ελέγχονται από τους υποδοχείς CXCR2 και CXCR4 και τους συνδέτες τους IL-8 και GRO-a [10]. Η IL-8 εκφράζεται εντόνως από τα μακροφάγα στο σημείο της βλάβης καθώς και από τα ECs και τα SMCs. Παρ' ότι πρόκειται για έναν χημειοτακτικό παράγοντα κυρίως για τα κοκκιοκύτταρα, η IL-8, υπό φυσιολογικές συνθήκες προωθεί και την ισχυρή σύνδεση των μονοκυττάρων που εκφράζουν CXCR2 στο ενδοθήλιο [15]. Όπως και στην περίπτωση των RANTES, GRO-a και FKN, η IL-8 συμμετέχει στην ισχυρή προσκόλληση των κυλιόμενων μονοκυττάρων στα αρχικά στάδια της αθηροσκλήρωσης [10,11]. Επιπλέον, υπονοείται η συμμετοχή της και σε πιο προχωρημένα στάδια της διαδικασίας, πιθανώς στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας [16].

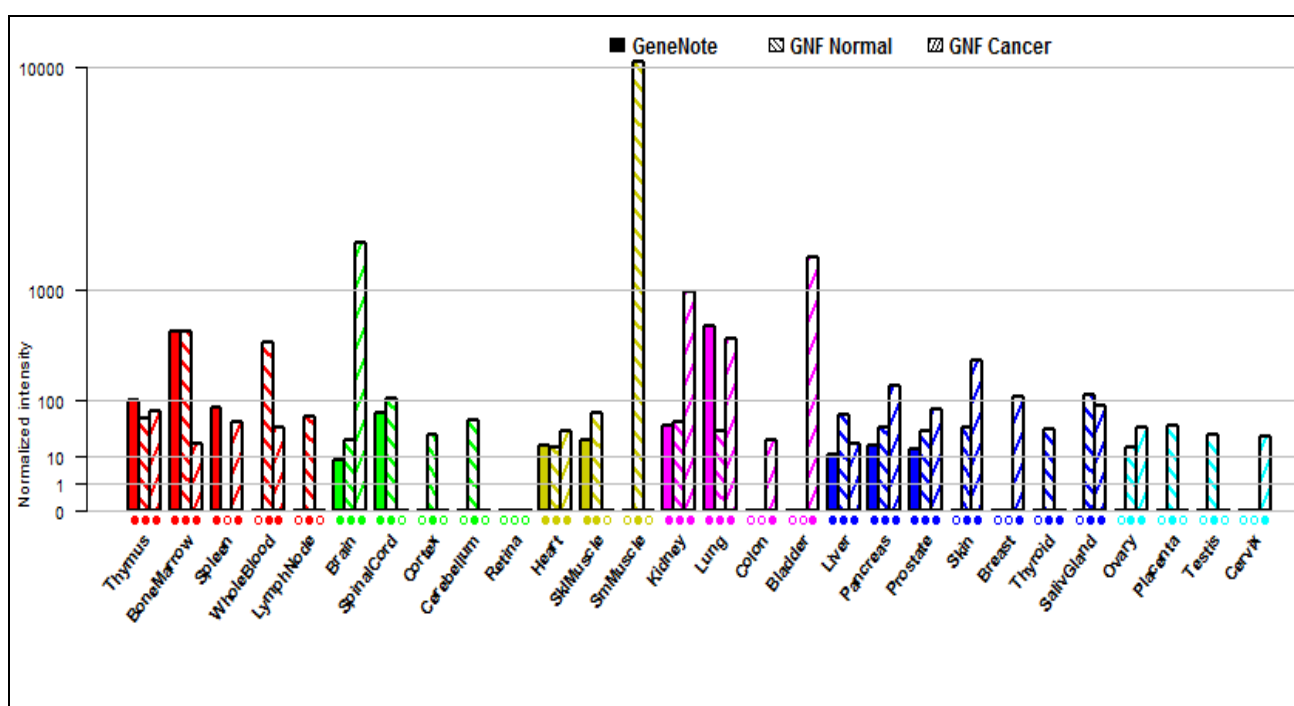
Διαφορετικές χημοκίνες προωθούν διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση της ίδιας χημοκίνης- συνδέτη με διαφορετικό κάθε φορά υποδοχέα, καταλήγει σε διάφορο αποτέλεσμα. Οι Weber et al., μέσω της χρήσης ειδικών ανταγωνιστών υποδοχέων, έδειξαν πως μόνο ο CCR1 υποδοχέας, και όχι ο CCR5, όταν συνδέεται με την RANTES, προκαλεί τη σύλληψη των μονοκυττάρων και ενεργοποιεί τα T και τα Th κύτταρα. Ο CCR5 προωθεί την εξάπλωση των κυττάρων κατά μήκος του ενδοθήλιου, ενώ ο CCR5 όσο και ο CCR1 συμβάλλουν στην διαενδοθηλιακή χημειοταξία των ενεργοποιημένων από την RANTES κυττάρων [17]. Επιπρόσθετα, ειδικές αλληλεπιδράσεις χημοκίνης/ υποδοχέα οδηγούν, όχι μόνο στην επιστράτευση συγκεκριμένων μονοκυτταρικών πληθυσμών, αλλά και στη χημειοταξία και ενεργοποίηση διακριτών μονοκυτταρικών υποομάδων [10]. Είναι λοιπόν φανερό, πως μονοπάτια ενεχόμενα στην αθηροσκλήρωση, όπως FKN/CX3CR1, MCP-1/CCR2, GRO-α/CXCR2, and IL-8/CXCR2, επιστρατεύονται σε συγκεκριμένα στάδια της δημιουργίας της βλάβης με έναν ιδιαίτερος εξειδικευμένο και συνεργατικό τρόπο.

IL-8 ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Η αρχική αναγνώριση της IL-8 ως κύριου χημειοτακτισμού παράγοντα για τα ουδετερόφιλα, περιόρισε τα δεδομένα που προκύπτουν από in vitro μελέτες και από ζωικά μοντέλα σε σχέση με το ρόλο της στην αθηρογένεση. Παρ' όλα αυτά η IL-8 έχει μελετηθεί αρκετά ως πιθανός δείκτης αθηροσκλήρωσης. Τα επίπεδα IL-8 στον ορρό έχουν δοκιμαστεί για τη δυνατότητα αναγνώρισης της παρουσίας υποκλινικής αθηροσκληρωτικής νόσου, καθώς επίσης για τη δυνατότητα πρόβλεψης της εμφάνισης και της βαρύτητας οξέων στεφανιαίων συνδρόμων.

Η IL-8 ή CXCL8 σύμφωνα με την τελευταία ονοματολογία, αποτελεί την πρότυπη χημοκίνη της CXC υποοικογένειας [18]. Η IL-8 εκκρίνεται ενεργά στην εξωκυττάρια ουσία ως αποτέλεσμα ποικιλίας κυτταρικών ερεθισμάτων. Είναι μία μικρή πρωτεΐνη.

Η ώριμη πλήρως λειτουργική μορφή της έχει μόνο 72 αμινοξέα. Η μεταγραφή του γονιδίου της IL-8 κωδικοποιεί 99 αμινοξέα, από τα οποία, με πρωτεολυτική διάσπαση προκύπτει το ενεργό πεπτίδιο των 77 αμινοξέων (μη ανοσοποιητικά κύτταρα) ή των 72 αμινοξέων σε μονοκύτταρα και μακροφάγα [19]. Μια μεγάλη γκάμα κυτταρικών τύπων που περιλαμβάνει σχεδόν όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα, είναι πιθανές πηγές IL-8 (Εικόνα 5) [18-20]. Οι κύριες πηγές της όμως είναι τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Η IL-8 φέρει την πρωτεύουσα «ευθύνη» στην επιστράτευση των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, τα οποία αποτελούν τα πρωταγωνιστικά κύτταρα στην οξεία φλεγμονώδη αντίδραση. Η κυτταρική επιστράτευση προκύπτει δια της δημιουργίας χημειοτακτικής κλίσης, η οποία και οδηγεί τα φλεγμονώδη κύτταρα προς περιοχές υψηλής συγκέντρωσης χημοκινών [21].



Εικόνα 5

Η χημειοτακτική κλίση, in vivo, μάλλον δημιουργείται από την πρόσδεση της IL-8 στις βασικές μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η κλίση αυτή, όχι μόνο υποβοηθά τη συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής, αλλά συμβάλλει σημαντικά και

στη παραμονή τους εκεί [21]. Εκτός από τη συγκέντρωση, η IL-8 εξυπηρετεί και την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων [18-21]. Τα παραπάνω βιολογικά δρώμενα διαμεσολαβούνται από την πρόσδεση της IL-8 σε δύο επιφανειακούς υποδοχείς, τους CXCR1 και CXCR2. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην κατηγορία των συνδεομένων με G πρωτεΐνη υποδοχέων, παρουσιάζουν σημαντική δομική ομοιότητα και εκκινούν σχεδόν πανομοιότυπες βιολογικές διαδικασίες [22,23]. Τα «σήματα» μεταφέρονται διά της μεμβράνης μέσω δομικών αλλαγών που προκαλούνται από τους συνδέτες και οι οποίες καταλήγουν στην έκθεση επιτόπων στους ενδοκυττάριους βρόγχους και στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα. Οι επίτοποι αυτοί προωθούν τη σύνδεση των G πρωτεϊνών προς τις λειτουργικές τους ετεροτριμερείς μονάδες [24,25]. Η βιολογική δραστηριότητα της IL-8 και άλλων CXC χημοκινών εξαρτάται εν μέρει από το μοτίβο αμινοξέων ELR. Η παρουσία αυτών των τριών ειδικών αμινοξέων είναι ζωτικής σημασίας για την πρόσδεση της IL-8 στους υποδοχείς της [26]. Η IL-8 είναι ανθεκτική στη θερμοκρασία και την πρωτεόλυση και είναι σχετικά ανθεκτική σε όξινο περιβάλλον, βιοχημικά χαρακτηριστικά που την κάνουν ιδανικό υποψήφιο μόριο για τις περιοχές της οξεία φλεγμονής, όπου χρειάζεται να επιβιώνει σε σκληρές κι εχθρικές συνθήκες. Ένα άλλο μοναδικό χαρακτηριστικό της IL-8 είναι η σχετική μακροβιότητα της στα σημεία της φλεγμονής. Παράγεται νωρίς στη διαδικασία της φλεγμονώδους αντίδρασης και παραμένει ενεργή για μία εκσεσημασμένα παρατεταμένη χρονική περίοδο, ακόμα και για ημέρες ή εβδομάδες. Αυτό, σε αντιδιαστολή με άλλες φλεγμονώδεις κυττοκίνες των οποίων η παραγωγή και η κάθαρση in vivo συμβαίνει πρακτικά μέσα σε μερικές ώρες [32]. Μία τρίτη ενδιαφέρουσα άποψη σχετικά με την IL-8 περιλαμβάνει την οξειδωτική ρύθμιση της γονιδιακής της έκφρασης. Η IL-8 είναι σημαντικά ευαίσθητη στα οξειδωτικά, και τα αντι-οξειδωτικά μειώνουν ουσιαστικά την έκφραση του γονιδίου της [27]. Ο ρόλος των οξειδωτικών στη ρύθμιση της έκφρασης της IL-8 και άλλων χημοκινών συσχετίζεται με την καρδιαγγειακή νόσο, στην οποία το οξειδωτικό

stress που προκαλείται από την ισχαιμία αποτελεί τόσο δείκτη της νόσου, όσο και θεραπευτικό στόχο.

In vitro μελέτες και ζωικά μοντέλα

Μετά το 1987, οπότε ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε η IL-8, ποικίλες έρευνες ασχολήθηκαν και κατέδειξαν τη συμμετοχή της τόσο στη λευκοκυτταρική κινητοποίηση και ενεργοποίηση όσο και στην αθηροσκληρωτική διαδικασία.

Πρώτοι οι Rus et al. αναφέρουν υψηλά επίπεδα IL-8 στο ανθρώπινο αθηροσκληρωτικό αρτηριακό τοίχωμα, ως κυτταρική και εξωκυττάρια εναπόθεση στη θεμέλια ουσία του συνδετικού ιστού [28]. Με τη χρήση ELISA, απεδείχθη η ποσοτική υπεροχή της IL-8 στις αθηρωματικές πλάκες σε σχέση με το φυσιολογικό ενδοθήλιο. Περαιτέρω έρευνες ανέδειξαν τα μακροφάγα σαν βασική πηγή IL-8 (κυρίαρχη θέση παραγωγής IL-8 mRNA) στις αθηρωματικές πλάκες [29]. Αργότερα, αυξημένη IL-8 ανιχνεύεται στα αφρώδη κύτταρα από ανθρώπινο αθηροσκληρωτικό ιστό εν συγκρίσει με μονοκύτταρα ή μακροφάγα από κυτταρικές καλλιέργειες ενώ καταδεικνύεται η ρύθμιση παραγωγής της από οξυστερόλες *in vitro* δόσο- και χρονο-εξαρτώμενα [30]. Δεν είναι όμως μόνο τα μακροφάγα εν δυνάμει πηγές IL-8, αλλά πρακτικά κάθε κυτταρικός συντελεστής του αγγειακού τοιχώματος. Τα ECs επίσης, φαίνεται να συμμετέχουν στην παραγωγή IL-8. Επίδραση σε καλλιέργειες ECs με στατίνη μειώνει την έκκριση IL-8 ενώ επίδραση με ομοκυστεΐνη, αναγνωρισμένο ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για αθηροσκλήρωση, αυξάνει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την έκκρισή της (Dje N'Guessan et al., Geisel et al.) [31-32]. Οι Ryo et al. αναφέρουν και τα SMCs ως πιθανή πηγή IL-8, παρουσιάζοντας πειραματικά αυξημένη παραγωγή IL-8 σε μεταγραφικό επίπεδο με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο από διεγερμένα με LDL SMCs [33]. Παρομοίως, οι Ito et al. αναφέρουν ότι η AngII αύξησε την παραγωγή IL-8 ενώ η φλουβαστατίνη μείωσε τόσο τη βασική όσο και την προκληθείσα από την AngII παραγωγή της χημοκίνης στα SMCs. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν πως η AngII πιθανώς να επιδεινώνει

την αθηροσκληρωτική διαδικασία μέσω παραγωγής IL-8 στα SMCs. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι οι στατίνες πιθανώς οδηγούν σε θεραπευτικά αποτελέσματα μέσω τροποποίησης της σύνθεσης της IL-8 σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση [34].

Εκτός από τον εντοπισμό της IL-8 στις αθηρωματικές πλάκες, ποικίλες έρευνες ασχολήθηκαν με τα βιοχημικά μονοπάτια, τα οποία οδηγούν στην απελευθέρωση IL-8 στα σημεία αθηρωμάτωσης. Η ταχύτατη και ισχυρή σύνδεση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων υπό την επίδραση της IL-8 στα μονοστοιβαδικά επιθήλια που εκφράζουν σελεκτίνη E (Gerszten et al.) [35], η προαγωγή της σύνθεσης DNA και της διέγερσης κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε αμφοτέρα ανθρώπινα και ζωικά αορτικά SMCs (Yue et al.), η αναστολή της *in vitro* συσσώρευσης TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase) και εν συνεχεία η δημιουργία ανισορροπίας μεταξύ μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας και TIMP-1 στις εστίες ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας (Moreau et al.) είναι μερικές από τις διεργασίες που προτάθηκαν σχετικά με τη δράση της IL-8 στο πάσχον ενδοθήλιο [36,37].

Οι Rydberg et al. πειραματιζόμενοι με ανθρώπινα μακροφάγα, έδειξαν πως, τόσο η υποξία όσο και η 25- υδροξυχοληστερόλη (25-OH-cho) προάγουν την αύξηση της παραγωγής IL-8 μέσω της αύξησης των ενδοκυτταρίων επιπέδων H₂O₂, ενώ οι Yang et al., μελετώντας ECs από ανθρώπινη ομφαλική φλέβα, έδειξαν την προαγωγή και ρύθμιση της παραγωγής IL-8 από TNF-α σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο, καθώς και την θεραπευτική δράση της ασπιρίνης μέσω της καταστολής του TNF-α και επομένως της αναστολής παραγωγής MCP-1 και IL-8 από τα εν λόγω κύτταρα [38,39]. Μια άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη χρησιμοποίησε SMCs από θωρακική αορτή αυθορμήτως υπερτασικών αρουραίων (spontaneously hypertensive rats- SHR) και νορμοτασικών αρουραίων Wistar- Kyoto (WKYs) για τη σύγκριση των επιπέδων IL-8, φανερώνοντας σαφώς αυξημένα επίπεδα στα υπερτασικά ζώα (Kim et al.) [40].

Τέλος, σε ένα αρκετά πρωτότυπο πείραμα, οι Henrichot et al. έδειξαν πως ο εγγύς των αγγειακών τοιχωμάτων Περιαγγειακός Λευκός Λιπώδης Ιστός (pWAT), ο οποίος αυξάνεται σημαντικά με μια εμπλουτισμένη σε λιπαρά διαίτα, αποτελεί δυνητική πηγή

IL-8, ιδιαίτερα σε θέσεις που αναπτύσσουν συνήθως αθηροσκλήρωση. Οι συγγραφείς προτείνουν την πιθανή συσχέτιση της αθηρωματικής νόσου με την παχυσαρκία μέσω της εκκριτικής και χημοτακτικής δράσης του συγκεκριμένου ιστού [41].

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς και μάρτυρες

Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη

Αθηροσκλήρωση και Στεφανιαία Νόσος: Τριακόσιοι ασθενείς με Στεφανιαία Νόσο [ΣΝ] (CAD group) και 189 υγιείς μάρτυρες (non-CAD group) στρατολογήθηκαν αρχικά από 2 ανεξάρτητα καρδιολογικά τμήματα σε χρονικό διάστημα 2 ετών. Η ΣΝ ορίστηκε ως αγγειογραφικά τεκμηριούμενη στένωση μίας τουλάχιστον επικάρδιας αρτηρίας σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 70% του αυλού της. Η ομάδα των μαρτύρων αποτελούνταν από άτομα αντιστοίχου ηλικίας, τα οποία είχαν υποβληθεί σε στεφανιαία αγγειογραφία κατά την ίδια χρονική περίοδο με τους στεφανιαίους ασθενείς. Τα αποτελέσματα της στεφανιογραφίας των τελευταίων αυτών ασθενών ήταν αρνητικά ως προς την παρουσία ΣΝ. Οι υγιείς μάρτυρες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να έχουν ακόμα έναν τουλάχιστον συμβατικό προδιαθεσικό παράγοντα για ΣΝ, εκτός από το φύλο και την ηλικία. Τα κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πενήντα εννιά ασθενείς και 29 υγιείς μάρτυρες εξαιρέθηκαν από τη μελέτη λόγω έλλειψης αναγκαίων κλινικών δεδομένων ή λόγω τεχνικής αστοχίας κατά τη διαδικασία της γονοτυπικής ανάλυσης (genotyping)

Εκ των στεφανιαίων ασθενών, 241 (μέση ηλικία 65 έτη, αναλογία ανδρών: γυναίκες 4.4) συμπεριλήφθηκαν τελικά στη μελέτη αντιστοίχησης γονοτύπου- φαινοτύπου παράλληλα προς 157 υγιείς μάρτυρες (μέση ηλικία 65 έτη, αναλογία ανδρών: γυναίκες 2.5).

Πίνακας 1. Κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά ασθενών και υγιών μαρτύρων

	CAD n(%)	nonCAD n(%)
Ηλικία	64±0.7	63±1
Αρσενικό γένος	197 (81.7)	112 (71.3)*
Διαβήτης	86 (35.7)	32 (20.4)*
Αρτηριακή Υπέρταση	68 (28.2)	62 (39.5)
Δυσλιπιδαιμία	193 (77.5)	103 (65.6)*
Κάπνισμα	121 (50.2)	53 (33.8)*
Θετικό οικογενειακό ιστορικό	120 (49.8)	59 (37.6)*
Αριθμός νοσούντων αγγείων		
1	95 (39.4)	
2	55 (22.8)	
3	91 (37.8)	
Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο	121 (50.2)	-
Οξύ Έμφραγμα Μυοκαρδίου	58 (24.1)	
Σύνολο	241	157

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των ασθενών (%). Η ηλικία εκφράζεται ως μέσος όρος ± SEM (τυπικό σφάλμα).

*p < 0.05.

CAD: coronary artery disease, nonCAD: non-(significant) coronary artery disease

Αθηροσκλήρωση και επαναστένωση: Κατά τη διάρκεια χρονικής περιόδου 2 ετών, συγκεντρώθηκαν 201 ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο (μέση ηλικία 64, αναλογία ανδρών: γυναίκες 8.1), οι οποίοι παρουσίασαν κλινικά συμπτώματα επανεμφάνισης μυοκαρδιακής ισχαιμίας 1 μήνα ως και 2 έτη μετά την υποβολή τους σε Διαδερμική Ενδοστεφανιαία Παρέμβαση [percutaneous coronary intervention (PCI)]. Κλινικές εκδηλώσεις επανεμφανιζόμενης ισχαιμίας θεωρήθηκαν οι εξής: επανεμφάνιση στηθαγχικού πόνου προσπαθείας, εμφάνιση οξέος Στεφανιαίου Συνδρόμου, εμφανιζόμενες εκ νέου ενδείξεις μυοκαρδιακής ισχαιμίας στην Ηλεκτροκαρδιογραφική Δοκιμασία Κοπώσεως, την Υπερηχοκαρδιογραφία φόρτισης (stress echocardiography) ή στη SPECT (single-photon emission computed tomography) απεικόνιση της μυοκαρδιακής αιμάτωσης. Όλοι οι ασθενείς επανεκτιμήθηκαν αγγειογραφικά και ταξινομήθηκαν ανάλογα με την αγγειογραφική κατάσταση της ήδη διανοιχθείσας βλάβης, σε δύο επιμέρους ομάδες: ομάδα με επιβεβαιωμένη Ενδοπροθεματική Επαναστένωση [in-stent restenosis (ISR)] και ομάδα με επιβεβαιωμένη Απουσία Ενδοπροθεματικής Επαναστένωσης [non-in-stent restenosis (non-ISR)]. Μία επιπλέον ομάδα αναφοράς δημιουργήθηκε, αποτελούμενη από 147 άτομα αντιστοίχου ηλικίας (αναλογία ανδρών: γυναίκες 2.5:1) με αγγειογραφικά επιβεβαιωμένη απουσία οποιασδήποτε καρδιαγγειακής νόσου (non-CAD). Τα κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά συνοψίζονται στον Πίνακα 2. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν καυκάσιοι Έλληνες. Έγγραφη συγκατάθεση μετά από ενημέρωση ελήφθη από όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη. Το ερευνητικό πρωτόκολλο είναι πλήρως εναρμονισμένο με τον κώδικα ηθικής και δεοντολογίας της Διακήρυξης του Ελσίνκι (1975) όπως αυτή εφαρμόζεται και εκ των προτέρων τηρείται από τις επιτροπές βιοηθικής του Πανεπιστημίου και Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Κρήτης και του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου.

Πίνακας 2. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με κλινικά σημεία επανεμφανιζόμενης ισχαιμίας μετά από Διαδερμική Ενδοστεφανιαία Παρέμβαση- PCI.

	ISR (n=73)	no ISR (n=128)	Non-CAD (n = 147)
Μέση ηλικία (±SEM)	64 (1.1)	64 (0.8)	62 (1.1)
Αρσενικό γένος	67 (91.8)	110 (85.9)	105 (71.4)
Αρτηριακή Υπέρταση	68 (93.2)	105 (82)	87 (59.2)
Διαβήτης	38 (52.1)	61 (47.7)	25 (17)
Δυσλιπιδαιμία	73 (100)	126 (98.4)	99 (67.3)
Κάπνισμα	50 (68.5)	71 (55.5)	59 (40.1)
Θετικό οικογενειακό ιστορικό	31 (42.5)	54 (42.2)	60 (40.8)
Μέσος χρόνος (ημέρες) επανεκτίμησης με αγγειογραφία μετά την PCI	265 (130-553)	285 (184-602)	
Αριθμός νοσούντων αγγείων:			
1	15 (20.5)	36 (28.1)	
2	15 (20.5)	38 (29.7)	
3	43 (59)	54 (42.2)	
Κλινική εκδήλωση:			
Ασταθής Νόσος	15 (20.5)	29 (22.7)	
Σταθερή Νόσος	58 (79.5)	99 (77.3)	
Τύπος stent:			
BMS	39(53.4)	54 (42.2)	
DES	33(45.2)	66 (51.6)	
BMS and DES	1 (1.4)	8 (6.3)	

Οι τιμές αναφέρονται στον αριθμό των συμμετεχόντων στη μελέτη (%) ή στους μέσους όρους (± SEM).

ISR: in stent restenosis, DES: Drug eluting stent, BMS: Bare metal stent.

Κλινικά χαρακτηριστικά

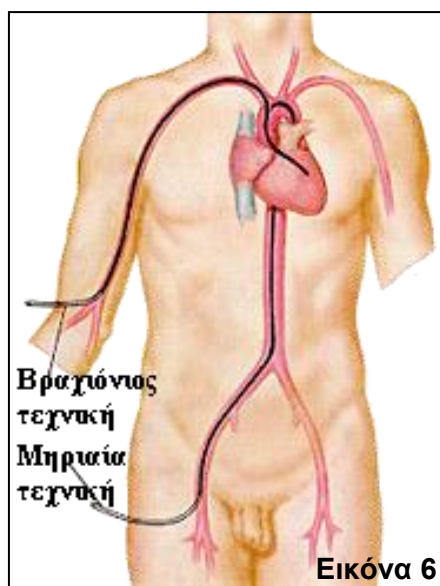
Τα κλινικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας, του φύλου, του καπνίσματος, του ιστορικού Σακχαρώδους Διαβήτη [ΣΔ], της δυσλιπιδαιμίας, της υπέρτασης, του οικογενειακού ιστορικού και της κλινικής εκδήλωσης ΣΝ, συσχετίστηκαν με τους μελετώμενους πολυμορφισμούς. Το κάπνισμα ορίστηκε ως συστηματική χρήση καπνού κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της έρευνας ή στο παρελθόν. Ως διαβητικοί χαρακτηρίστηκαν οι ασθενείς ή οι μάρτυρες με επίπεδα σακχάρου νηστείας στο αίμα πάνω από 126 mg/dl ή εκείνοι οι οποίοι τηρούσαν τροποποιημένη δίαιτα ή λάμβαναν αγωγή με υπογλυκαιμικούς παράγοντες ή ινσουλίνη κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ως υπέρταση ορίστηκε η Συστολική Αρτηριακή Πίεση (ΣΑΠ) πάνω από 140 mmHg και/ ή Διαστολική Πίεση (ΔΑΠ) πάνω από 90 mmHg σε τρεις τουλάχιστον διακριτές μετρήσεις. Οι περιπτώσεις είχαν διαγνωστεί στο παρελθόν με τα προαναφερθέντα κριτήρια και, είτε ο ασθενής λάμβανε φαρμακευτική αγωγή ή θεραπευόταν με τροποποίηση του τρόπου ζωής. Προκειμένου να οριστεί η δυσλιπιδαιμία εφαρμόστηκε το φυσιολογικό όριο για το γενικό πληθυσμό. Όσον αφορά τους ήδη (προ της έρευνας) διεγνωσμένους στεφανιαίους ασθενείς, ως δυσλιπιδαιμία ορίστηκε η θεραπεία με υπολιπιδαιμικό παράγοντα ή με τροποποίηση του διαιτολογίου ή η ύπαρξη επιπέδων λιπιδίων ορού μεγαλύτερων από εκείνα που συστάθηκαν από την Τρίτη Κοινή Ομάδα Εργασίας της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρίας για την πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου [42]. Ως θετικό οικογενειακό ιστορικό θεωρήθηκε η παρουσία εμφράγματος του μυοκαρδίου σε τουλάχιστον έναν από τους δύο γονείς. Η ΣΝ κατηγοριοποιήθηκε περαιτέρω σε νόσο 1, 2 ή 3 αγγείων ανάλογα με τον αριθμό των κύριων επικάρδιων αγγείων που παρουσιάζουν τουλάχιστον 70% ενδοαυλική στένωση. Οι κλινικές εκδηλώσεις της ΣΝ καταγράφηκαν επίσης και η ομάδα των ασθενών της έρευνας διαχωρίστηκε περαιτέρω σε ασθενείς με Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο –ασταθής στηθάγχη, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου– (ACS group, n=121) και ασθενείς με σταθερή νόσο –υποκλινική ισχαιμία, σταθερή στηθάγχη– (non-ACS group, n=120).

Ως Επαναστένωση (In-stent restenosis- IRS) ορίστηκε η μείωση της διαμέτρου του τμήματος του αγγείου, στο οποίο είχε τοποθετηθεί stent $\geq 50\%$, κατά την αγγειογραφία επαναξιολόγησης.

Μέθοδοι

Καρδιακός καθετηριασμός- Στεφανιογραφία

Ο καρδιακός καθετηριασμός αποτελεί πλέον απαραίτητη εξέταση για την οριστική διάγνωση της ΣΝ (Εικόνα 6). Σε κάθε περίπτωση που ένα καρδιακό νόσημα δεν μπορεί να εκτιμηθεί επαρκώς με μη επεμβατικές μεθόδους καθώς και σε κλινικά διαγνωσμένα στεφανιαία σύνδρομα, ο καρδιακός καθετηριασμός δίνει πολύτιμες πληροφορίες για την ύπαρξη ή μη, τη σοβαρότητα και την έκταση της ΣΝ ενώ αποτελεί συγχρόνως οδό προσπέλασης των στενωμένων στεφανιαίων αγγείων και διενεργείας της τόσο διαδεδομένης και πολύτιμης επεμβατικής θεραπευτικής



μεθόδου της αγγειοπλαστικής. Οι στόχοι του καρδιακού καθετηριασμού χωρίζονται κυρίως σε τρεις κατηγορίες: αιμοδυναμική εκτίμηση, αγγειογραφία και στεφανιογραφία.

Η προσπέλαση της συστηματικής κυκλοφορίας γίνεται συχνότερα μέσω της αριστερής ή της δεξιάς μηριαίας αρτηρίας είτε μέσω της δεξιάς βραχιονίου αρτηρίας. Η απεικόνιση της αριστερής και της δεξιάς στεφανιαίας αρτηρίας γίνεται με

ειδικά προσχηματισμένους καθετήρες, οι οποίοι διευκολύνουν την εκλεκτική έγχυση σκιαγραφικής ουσίας στα αντίστοιχα στόμια των στεφανιαίων αρτηριών. Η λήψη πολλαπλών εικόνων (προβολών) των στεφανιαίων αγγείων εξασφαλίζει την πληρέστερη εκτίμηση της ανατομίας, της πορείας και των στενώσεων των στεφανιαίων αρτηριών. Οι στενώσεις εκφράζονται ως επί τοις εκατό μείωση της

διαμέτρου του αγγείου και θεωρούνται σημαντικές, όταν είναι μεγαλύτερες από 50%. Στην παρούσα μελέτη όλες οι στεφανιογραφίες εκτελέστηκαν με μηριαία προσπέλαση. Χρησιμοποιήθηκαν 6F καθετήρες εγχύσεων. Τα στοιχεία αποθηκεύτηκαν σε κινηματογραφική ταινία 35mm και δύο έμπειροι καθετηριαστές υπολόγισαν ανεξάρτητα τη βαρύτητα των βλαβών και το ποσοστό στένωσης.

Γονοτυπική ανάλυση

Γενομικό DNA απομονώθηκε από 10 ml ηπαρινισμένου φλεβικού αίματος τηρώντας το καθιερωμένο πρωτόκολλο: Το αίμα αρχικά αιμολύεται με την χρήση διαλύματος σαπώνων (Reagent A) και στην συνέχεια επωάζεται σε διάλυμα NaClO₄. Στη συνέχεια το DNA εκχυλίζεται με την χρήση διαλύματος φαινόλης και χλωροφορμίου και κατακρημνίζεται με καθαρή αιθανόλη. Το τελικό προϊόν μετά από καθαρισμό με αιθανόλη 70% επαναδιαλύεται σε απεσταγμένο/αποστειρωμένο ύδωρ (dH₂O). Η περιεκτικότητα και η καθαρότητα του εκάστοτε DNA δείγματος αξιολογείται φωτομετρικά με την απορρόφηση του δείγματος στα 260 και τον λόγο απορρόφησης 260/280 nm αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα αίματος ελήφθησαν πριν από τον καθετηριασμό.

Η γονοτυπική ανάλυση για τον πολυμορφισμό 251 A/T εκτελέστηκε με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και την επιστράτευση αλληλοειδικών εκκινητών.

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, το DNA επωάζεται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία θερμοανθεκτικού ενζύμου (TaqDNA-πολυμεράσης), μίγματος δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και κατάλληλου ζεύγους εκκινητών (allele-specific primers) που πλαισιώνουν την πολυμορφική περιοχή. Αρχικά το DNA αποδιάσσεται θερμικά στους 96°C (4') και ακολουθούν 5 κύκλοι με διαδοχική επώαση του διαλύματος στους 95 °C- 25 sec (αποδιάταξη), 68°C- 45 sec (υβριδισμός των εκκινητών) και 72°C- 40 sec (πολυμερισμός). Λόγω ιδιαιτερότητας της εκκινητικής λειτουργίας των αλληλοειδικών primers, απαιτούνται άλλες δύο αλληλουχίες επαναλαμβανόμενων κύκλων αποδιάταξης- υβριδισμού- πολυμερισμού,

η μία αποτελούμενη από 20 κύκλους και η αμέσως επόμενη από 5 κύκλους. Από αυτή τη διαδικασία προκύπτει ενισχυμένη μία γενομική περιοχή μήκους 336 bp, η οποία αντιστοιχεί στον εκκινητή του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 8 (IL-8) (εικ. 7A). Η θέση και η ύπαρξη του πολυμορφισμού 251A/T καθώς και η αντιστοιχία του προς το προκείμενο προϊόν της PCR επιβεβαιώθηκαν με τη μέθοδο της άμεσου γενομικής αλληλούχησης (direct DNA Sequencing).

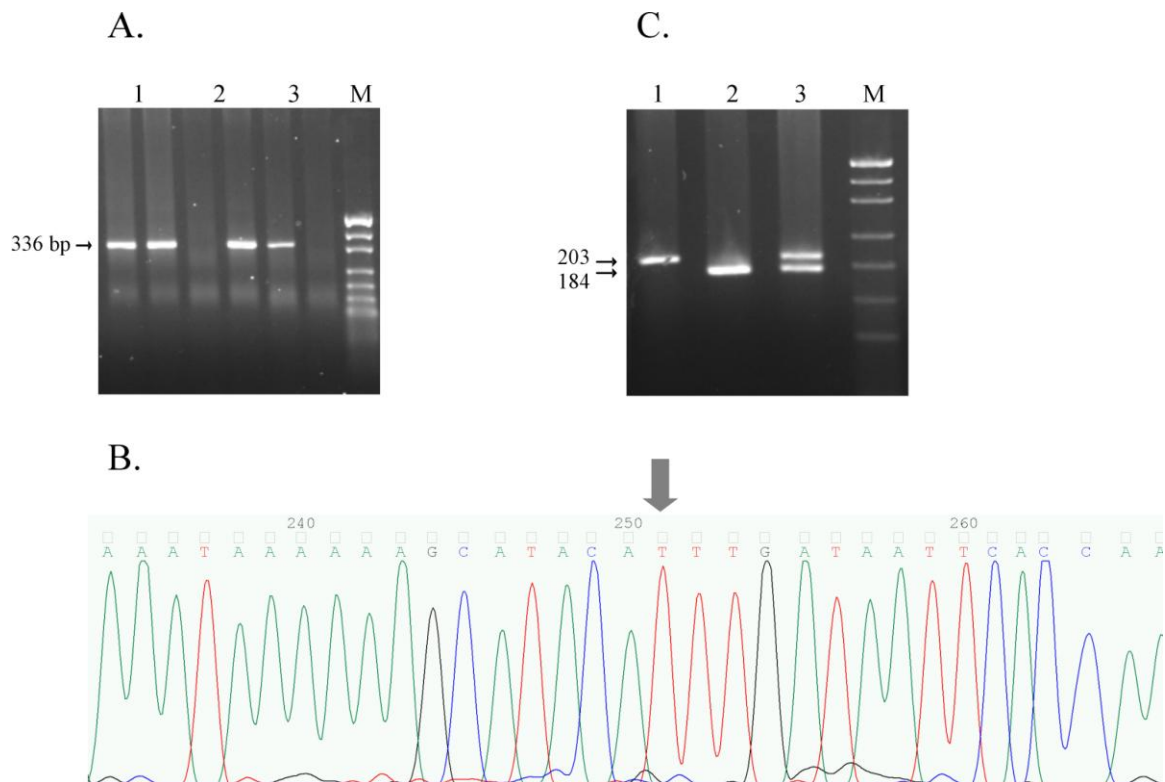
Όσον αφορά την ανίχνευση του πολυμορφισμού 781 C/T του εκκινητή του γονιδίου της IL-8, χρησιμοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI (PCR-RFLP). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται αρχικά PCR για την ενίσχυση της πολυμορφικής περιοχής. Στο παρόν πείραμα η μέθοδος είναι απλούστερη και συνίσταται μόνο σε μία αλληλουχία κύκλων αποδιάταξης- υβριδισμού- πολυμερισμού (35) . Από τη διαδικασία αυτή προκύπτει ενισχυμένο ένα τμήμα DNA μήκους 203 bp, το οποίο περιέχει την πολυμορφική προς διερεύνηση θέση. Εν συνεχεία πραγματοποιείται ολονύχτια επώαση στους 37°C και πέψη των δίκλωνων πολυνουκλεοτιδικών PCR προϊόντων με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση (restriction enzyme). Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε η ενδονουκλεάση EcoRI . Το ένζυμο δρα ή όχι στην νουκλεοτιδική αλληλουχία ανάλογα με την παρουσία ή απουσία της πολυμορφικής περιοχής. Η EcoRI, στην προκείμενη πέψη, αναγνωρίζει την «άγρια» αλληλουχία πέπτοντας την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα και παράγοντας δύο μικρότερα θραύσματα αυτής, αποτελούμενα αντίστοιχα από 184 bp και 19 bp. Τα PCR προϊόντα και τα προϊόντα της PCR-RFLP ανάλυσης ηλεktροφορούνται σε πηκτώματα αγαρόζης σε υδατικό μέσο με ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE (0.09 Tris-HCl, 0.09 M Βορικό οξύ, 2.5 mM EDTA, pH 8.3). Η χρώση του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεktροφόρησης οι ζώνες του DNA έγιναν ορατές με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (εικ. 7C).

Sequencing

Ο όρος DNA sequencing (διαδικασία γενομικής αλληλούχισης) περιλαμβάνει διάφορες μεθόδους και τεχνολογίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της σειράς νουκλεοτιδικών βάσεων –αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη– σε ένα μόριο DNA.

Η βασική αρχή στη διαδικασία αλληλούχισης είναι η χρήση τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) ως κατάληξη της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Η κλασσική μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας απαιτεί ένα πρότυπο μονόκλωνο μόριο DNA, έναν DNA εκκινητή, DNA πολυμεράση, κανονικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) και τροποποιημένα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) τα οποία τερματίζουν την επιμήκυνση της νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Τα ddNTPs είναι είτε ραδιενεργά σημασμένα είτε φθορίζοντα προκειμένου να καθίστανται ανιχνεύσιμα από αυτοματοποιημένες συσκευές sequencing. Το δείγμα DNA χωρίζεται σε 4 επιμέρους αντιδράσεις αλληλούχισης, οι οποίες περιέχουν τα 4 πρότυπα dNTPs (dATP, dGTP, dCTP και dTTP) και DNA πολυμεράση. Σε κάθε μία αντίδραση προστίθεται μόνο ένα από τα ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP και ddTTP) για τον τερματισμό της αλυσίδας. Κάθε ddNTP στερείται μίας 3'-OH ομάδας απαραίτητης για το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη λήξη της επέκτασης της νουκλεοτιδικής αλυσίδας και την παραγωγή τμημάτων DNA ποικίλου μήκους. Οι νεοσύστατες σημασμένες πλέον νουκλεοτιδικές αλυσίδες μετουσιώνονται θερμικά και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους (με διακριτική ισχύ ακόμα και ένα νουκλεοτίδιο) κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης- ουρίας με διαφορετική στήλη για κάθε αντίδραση (A, G, C, T). Κατόπιν οι μπάντες του DNA οπτικοποιούνται με τη χρήση αυτοραδιογραφίας ή υπεριώδους ακτινοβολίας και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων μπορεί να διαβαστεί πλέον από την εικόνα του πηκτώματος (εικ. 7B). Παραλλαγές αυτής της τεχνικής περιλαμβάνουν τη χρήση νουκλεοτιδίων με ραδιενεργό φώσφορο ή εκκινητών σημασμένων στο 5' άκρο τους με φθορίζουσα ουσία. Η αλληλούχιση με τη χρήση

φθορίζοντα εκκινήτη διευκολύνει την ανάγνωση σε οπτικό σύστημα για ταχύτερη και οικονομικότερη ανάλυση και αυτοματοποίηση. Επιπλέον, η χρήση φθορίζόντων ddNTPs επιτρέπει τον προσδιορισμό της αλληλουχίας σε μία ενιαία αντίδραση αντί για 4 επιμέρους αντιδράσεις. Καθένα από τα 4 ddNTPs λήξης σημαίνεται με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες καθεμία από τις οποίες εκπέμπει φως σε διαφορετικό μήκος κύματος. Η μέθοδος αλληλούχισης παρουσιάζει και «αδύναμα» σημεία σε σχέση με την ποιότητα και τις αποκλίσεις στα αποτελέσματα, σημεία όμως που περιορίζονται συνεχώς με τη βελτίωση των αντιδραστηρίων και την αυτοματοποίηση των περισσοτέρων διαδικασιών.



Εικόνα 7

A. Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης 2% ενός 251 A/T ετερόζυγου (1) ενός 251 T ομόζυγου (2) και ενός 251 A ομόζυγου (3) γονότυπου.

B. 251 TT γονότυπος όπως φαίνεται στην εικόνα από τη διαδικασία αλληλούχισης (sequencing) του προϊόντος 336bp που προέκυψε από την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (ASO-PCR). Το σημείο του πολυμορφισμού καταδεικνύεται από το γκρίζο βέλος.

C. Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης 2+1% των προϊόντων πέψης με EcoRI περιοριστική ενδονουκλεάση για τον δεύτερο πολυμορφισμό. 1. ομοζυγοτία ως προς το 781T αλληλόμορφο, 2. ομοζυγοτία ως προς τον 781C γονότυπο, 3. ετεροζυγοτία (781C/T γονότυπος). M: ruc19 DNA marker.

Κυτταροκαλιέργειες

Η μυελομονοκυτταρική σειρά THP-1 καλλιεργήθηκε σε RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS, 2 mM γλουταμίνη, 25 mM HEPES, 50 U/ml πενικιλίνη, και 50 U/ml στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων 500000/mL, στους 37°C σε περιβάλλον εμπλουτισμένο με CO₂ 50 mL/L. Η επιφανειακή έκφραση υποδοχέων χημοκινών στα PBMCs ποσοτικοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Ο φαινότυπος του υποδοχέα της χημοκίνης του υποπληθυσμού των μονοκυττάρων εκτιμήθηκε με την επαναξιολόγηση της μέσης έντασης φθορισμού (geo Mean) και του ποσοστού θετικών κυττάρων στην περιοχή των μονοκυττάρων στα ιστογράμματα του κυτταρομετρητή.

Τα κύτταρα επώαστηκαν με Αγγειοτενσίνη II (Ang II) - (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) ή με Λιποπολυσακχαρίτη (LPS) παρουσία ή μη Ανταγωνιστή του υποδοχέα της Ang II (ARB) που ήταν είτε Λοζαρτάνη είτε Τελμιζαρτάνη. Χρησιμοποιήθηκαν 2 ARBs αντί για ένα προκειμένου να διαπιστωθεί αν το φαινόμενο που επρόκειτο να μελετηθεί, εξαρτιόταν μόνο από ένα συγκεκριμένο φάρμακο (drug-effect) ή αν αφορούσε γενικότερα την κατηγορία των ανταγωνιστών του υποδοχέα της Ang II (class-effect). Εκτιμήθηκαν, αρχικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από 3 χρονικά σημεία (0, 24, 48 ώρες) και από συγκεντρώσεις Ang II κυμαινόμενες μεταξύ 0.2 και 20 μM. Όσον αφορά τη Λοζαρτάνη, στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συγκεντρώσεις από 10 ως 1000 μM, για να χρησιμοποιηθεί τελικά η καταλληλότερη συγκέντρωση των 100 μM. Το LPS χρησιμοποιήθηκε σε σταθερή συγκέντρωση 10ng/ml. Προκειμένου να ελεγχθεί αν η λοζαρτάνη επιτυγχάνει πιο εκτεταμένη σύνδεση με τους υποδοχείς της Ang II κι επομένως πιο ισχυρή ανταγωνιστική δράση αναλογικά με το χρόνο επώασης, τα THP-1 μονοκύτταρα καλλιεργήθηκαν δοκιμαστικά τόσο με προεπώαση 2 ωρών μόνο με λοζαρτάνη και κατόπιν με Ang II όσο και με ταυτόχρονη επώαση με τις δύο ουσίες.

Κυτταρομετρία Ροής

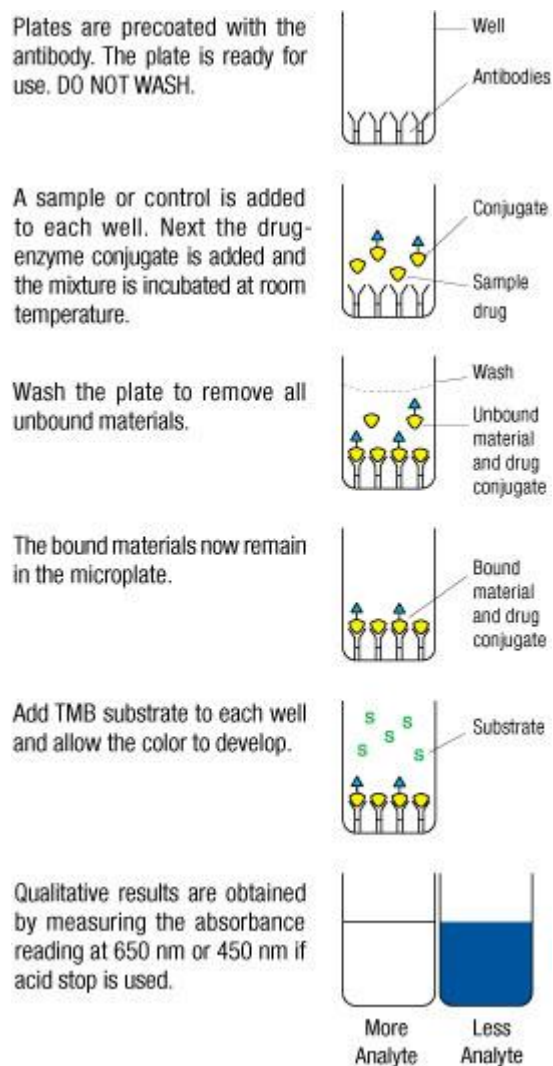
Η Κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/ και ηλεκτρονικής ανίχνευσης. Στις εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής μπορεί να περιλαμβάνεται και η ταξινόμηση των συστατικών βάσει φυσικών παραμέτρων. Μία δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Η χρώση των σωματιδίων με φθορίζοντα αντισώματα δίνει την δυνατότητα διαχωρισμού των υπό μελέτη κυτταρικών πληθυσμών βάση συγκεκριμένων φαινοτύπων επιφανείας αλλά και της εκτίμησης του βαθμού έκφρασης του αντιγόνου επιφανείας από την μέτρηση της έντασης φθορισμού (fluorescence intensity). Η έκφραση των υποδοχέων CXCR1 και CXCR2 υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας αντισώματα κατά αυτών

συνδεδεμένα με φυκοερυθρίνη (PE) (BD Bioscience, New Jersey, USA). Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές και αναφέρεται ως αποτέλεσμα η μέση ένταση φθορισμού \pm σταθερή απόκλιση (Standard deviation- SD). Σε κάθε περίπτωση, ισχύουν τα εξής: intra-assay CV <5% και inter-assay CV <10%.

ELISA

Η ενζυμοσυνδεδεμένη ανοσοαπορροφητική μελέτη (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ή αλλιώς ELISA, είναι μια βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία για να ανιχνεύσει την παρουσία ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε υπερκείμενα καλλιέργειών ή σε διάφορα υγρά συστατικά του οργανισμού (περιτοναϊκό υγρό, ορό αίματος, κ.α.) με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων. Η ELISA έχει χρησιμοποιηθεί σαν διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική και την παθολογία φυτών, καθώς και στον ποιοτικό έλεγχο στη βιομηχανία. Πιο αναλυτικά, στην ELISA, ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου προσδένεται σε μια επιφάνεια (συνήθως πολυστυρενίου- «πλάκα μικροτιτλοποίησης») είτε μη-ειδικά (μέσω προσρόφησης στην επιφάνεια) είτε ειδικά με την χρήση ενός επιπλέον αντισώματος (sandwich ELISA). Μετά την ακινητοποίηση του αντιγόνου προστίθεται το προς μελέτη αντίσωμα, το οποίο διαμορφώνει σύμπλοκο με το αντιγόνο. Αν δεν είναι εφικτή η άμεση ομοιοπολική σύνδεση του αντισώματος με το προσδεδεμένο στην επιφάνεια αντιγόνο, τότε χρησιμοποιείται ένα δευτερεύον αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο (υπεροξειδάση)- (Bioconjugation) και το οποίο μπορεί να ανιχνεύσει και να προσδεθεί ομοιοπολικά στο κυρίως αντίσωμα, συνήθως μέσω αναγνώρισης της σταθερής περιοχής του (Fc region). Τέλος προστίθεται το ενζυμικό υπόστρωμα παράγοντας οπτικό σήμα, το οποίο υποδηλώνει την ποσότητα του αντιγόνου στο κάθε δείγμα. Όπως και στα περισσότερα πρωτόκολλα τα οποία αφορούν τη χρήση αντισωμάτων, έτσι και στην ELISA, πριν την προσθήκη του πρώτου αντισώματος προηγείται το blocking για την παρεμπόδιση των μη-ειδικών συνδέσεων. Μεταξύ όλων των παραπάνω βημάτων παρεμβάλλονται πλυσίματα με κάποιο ελαφρύ απορρυπαντικό για την απομάκρυνση πρωτεϊνών ή αντισωμάτων που έχουν

συνδεθεί μη ειδικά. Η ELISA περιλαμβάνει τη χρήση χρωμογόνων ουσιών αναφοράς και υποστρώματα τα οποία παράγουν ορατή αλλαγή χρώματος στο διάλυμα έτσι ώστε να οπτικοποιείται η παρουσία του αντιγόνου ή γενικότερα της διαλυμένης ουσίας. Η καταγραφή και ποσοτικοποίηση αυτής της οπτικοποιημένης περιεκτικότητας γίνεται με τη χρήση φωτομετρικών συσκευών, οι οποίες παρέχουν αριθμητικές και συγκρίσιμες πλέον τιμές (εικ. 8).



Εικόνα 8 Συνοπτική αναπαράσταση των διαδοχικών σταδίων στην ELISA

Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, καλλιεργήθηκαν κύτταρα έως μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων 500000/mL. Στα προκαθορισμένα χρονικά σημεία, το καλλιεργητικό μέσον συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε σε 1500 rpm για 5΄,

προκειμένου να απομακρυνθούν θραύσματα κυττάρων ή άλλα σωματίδια. Το προκύπτον υπερκείμενο διάλυμα καταψύχθηκε στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για την ELISA. Η συγκέντρωση της IL-8 μετρήθηκε με τη χρήση ELISA kit (Bender Medsystems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, αφού καθοριστεί ο αριθμός θέσεων (wells) στην πλάκα μικροπιλοποίησης ο οποίος αντιστοιχεί στον αριθμό των προς μελέτη δειγμάτων συν τα τυφλά δείγματα σε διπλότυπα και τα πρότυπα δείγματα σε διπλότυπα επίσης, πλένεται η πλάκα με ακριβώς 300μl Wash Buffer/ well εξασφαλίζοντας πολύ σχολαστική αναρρόφηση των περιεχομένων ανάμεσα σε κάθε «πλύση». Στη συνέχεια, προστίθεται σε κάθε well ο ειδικός διαλύτης (sample diluent), με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργηθούν οι διαδοχικές αραιώσεις των τυφλών δειγμάτων και οι προκαθορισμένες αραιώσεις των προς μελέτη δειγμάτων. Προστίθενται ακολούθως 50μl του κάθε δείγματος στα προκαθορισμένα wells και αμέσως μετά 50 μl Biotin- conjugate σε όλα τα wells. Η πλάκα τοποθετείται για επώαση σε ελαφρά ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και μετά ξεπλένεται με 3 διαδοχικές πλύσεις. Κατόπιν προστίθεται ο δεύτερος παράγων Streptavidin- HRP σε όλα τα wells και η πλάκα τοποθετείται ξανά στις ίδιες συνθήκες επώασης για 1 ώρα αυτή τη φορά. Αφού γίνουν άλλες 3 πλύσεις όπως απαιτεί η διαδικασία, προστίθεται και ο τελευταίος παράγων TMB Substrate solution, η δράση του οποίου ανακόπτεται μετά από σύντομη επώαση (10' σε σκοτεινό σημείο) με τη χρήση του Stop Buffer. Το περιεχόμενο του κάθε well έχοντας πλέον οριστικά χρωματιστεί, είναι έτοιμο να φωτομετρηθεί. Η πλάκα μικροπιλοποίησης τοποθετείται σε φωτόμετρο φασματοσκοπίας το οποίο χρησιμοποιεί ως βασικό μήκος κύματος τα 450nm. Τα αποτελέσματα της φωτομετρίας καταγράφονται και αναλύονται σε καμπύλη γραφική παράσταση δεδομένη από το σχεδιαστή του kit προκειμένου να προκύψουν οι τελικές προς στατιστική ανάλυση τιμές. Το κάθε πείραμα εκτελέστηκε και σ' αυτήν την περίπτωση 3 φορές από τις οποίες προέκυψαν μέσες συγκεντρώσεις (ng/ml) \pm SD.

Στατιστική ανάλυση

Γονοτυπική ανάλυση: Οι συχνότητες των γονοτύπων για κάθε πολυμορφισμό συγκρίθηκαν αρχικά με τις προβλεπόμενες κατά Hardy-Weinberg μέσω ανάλυσης με χ^2 . Υπολογίστηκαν οι συχνότητες των απλοτύπων και εκτιμήθηκε η ανισοκατανομή σύνδεσης (linkage disequilibrium), με τη χρήση του κλασσικού στατιστικού συντελεστή ανισοκατανομής. Η συσχέτιση του κάθε μελετώμενου πολυμορφισμού προς τα κλινικά χαρακτηριστικά υπολογίστηκε αρχικά με ανάλυση κατά χ^2 με 2 βαθμούς ελευθερίας (degrees of freedom- df). Ο βαθμός συσχέτισης του κάθε γονοτύπου με τη νόσο εκτιμήθηκε αρχικά με Pearson's χ^2 analysis ή με Fisher exact test όπου κρίθηκε απαραίτητο (αναμενόμενες συχνότητες <5). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε προσαρμογή, για τον κάθε παράγοντα κινδύνου των ασθενών (ηλικία, φύλλο, καπνιστικές συνήθειες, Σακχαρώδης Διαβήτης, Αρτηριακή Υπέρταση, δυσλιπιδαιμία και οικογενειακό ιστορικό), περιλαμβάνοντας τους ως μεταβλητές σε μοντέλο λογαριθμικής εξάρτησης (logistic regression model). Προκειμένου να προκύψουν επιμέρους πηλικά διαγώνιων γινομένων [odds ratios (ORs)] για τον κάθε γονότυπο, χρησιμοποιήθηκε ο πιο κοινός γονότυπος σαν ομάδα αναφοράς. Αμφότερα τα προσαρμοσμένα και μη ORs αναφέρονται στην παρουσία στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων ή οριακά στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων. Λαμβάνοντας υπ' όψιν το μέγεθος του δείγματος πρωτοεμφανιζόμενης ΣΝ, η μελέτη παρουσιάζει ισχύ 88% προκειμένου να ανιχνευθεί διαφορά στις συχνότητες των αλληλομόρφων της τάξης του 15%, υποθέτοντας συχνότητα 20% του σπάνιου αλληλόμορφου στην ομάδα ελέγχου και για τιμή κριτηρίου $p=0.05$.

Όσον αφορά το δείγμα πληθυσμού με επαναστένωση ή μη, η μελέτη παρουσιάζει ισχύ 80% προκειμένου να ανιχνευθεί αύξηση 1.55 φορές στις συχνότητες των αλληλομόρφων, υποθέτοντας συχνότητα 40% του σπάνιου αλληλόμορφου στην ομάδα ελέγχου και για τιμή κριτηρίου $p=0.05$. Οι αριθμητικές τιμές εκφράζονται ως μέσες τιμές (means) \pm τυπικό σφάλμα (SEM), και οι διαφορές μεταξύ των μέσων

τιμών συγκρίθηκαν με την εφαρμογή t ελέγχου για ανεξάρτητες μεταβλητές. Σε όλες τις περιπτώσεις, η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε σε τιμή κριτηρίου p μικρότερη από 0.05. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό SPSSv10 (SPSS Inc., 188 Chicago IL, USA). Όλες οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις διορθώθηκαν περαιτέρω για πολυπαραγοντική δοκιμασία με τη χρήση διαδικασίας διόρθωσης κατά Bonferroni. Ο βαθμός στατιστικής σημαντικότητας προσαρμόστηκε διαιρούμενος δια του πλήθους των εμπλεκόμενων μελετώμενων μεταβλητών (n). Ως στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα θεωρήθηκαν εκείνα που παρουσίασαν τιμές $p < 0.005$ στη σύγκριση των συνδεδεμένων γονοτύπων ($n=9$) και τιμές $p < 0.017$ στη δοκιμασία των μεμονωμένων γονοτύπων ($n=3$). Παρακάτω επαναξιολογούνται και παρουσιάζονται οι μη διορθωμένες p values, καθώς και η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων πριν και μετά τη διόρθωση Bonferroni.

Κυτταροκαλλιέργειες (FACS/ ELISA): Δοκιμασία t για εξαρτημένες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να υπολογιστούν οι διαφορές ανάμεσα στα ποσοστά. Η δοκιμασία t για εξαρτημένες μεταβλητές παρέχει τη δυνατότητα αποκλεισμού των στατιστικών σφαλμάτων που οφείλονται σε διαφορετική βασική έκφραση της IL-8 ανάμεσα στα διαφορετικά πειράματα. Τιμές p μικρότερες του 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γονοτυπική ανάλυση

IL-8 και Στεφανιαία Νόσος: Η επικράτηση των πολυμορφισμών 251 A/T και 781 C/T του εκκινήτη του γονιδίου της IL-8, αναλύθηκε σε 241 ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο ποικίλης βαρύτητας και σε 157 υγιείς μάρτυρες. Οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων για όλους τους μελετώμενους συνδυασμούς παρουσιάζονται στους Πίνακες 3, 4, 5. Οι γονοτυπικές συχνότητες συμφωνούν με εκείνες που προβλέπονται από την ισορροπία Hardy–Weinberg σε όλες τις ομάδες και από την ανάλυση της ανισοκατανομής σύνδεσης (linkage disequilibrium) προκύπτει ισχυρή σύνδεση μεταξύ των 2 γονιδιακών τόπων (loci). $D'=0.93$

Η γονοτυπική ανάλυση ανέδειξε 4 κοινούς συνδεδεμένους γονότυπους (από τους 9 πιθανούς), οι οποίοι αναφέρονται σε περισσότερο από το 90% του γενικού πληθυσμού. Η ανάλυση των απλότυπων, επίσης, ανέδειξε 3 κυρίαρχους απλότυπους και τον εξαιρετικά σπάνιο $T_{251}T_{781}$ απλότυπο, ο οποίος αναφέρεται σε ποσοστό γενικού πληθυσμού μικρότερο του 1%. (Πίνακας 6).

Κατά τη γονοτυπική ανάλυση, στην ομάδα non-ACS επικρατεί ο γονότυπος του 251A αλληλομόρφου σε ομοζυγοτία εν συγκρίσει με την ομάδα ACS (OR=0.49, 95% CI: 0.24–1.0, $p=0.07$). Η διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες ενισχύεται σε στατιστική σημαντικότητα όταν εφαρμόζεται ανάλυση λογαριθμικής εξάρτησης (logistic regression) (OR=0.44, 95% CI: 0.2–0.98, $p=0.04$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε επικράτηση του συνδεδεμένου γονοτύπου $AA_{251}TT_{781}$ στην ομάδα non-ACS (OR=0.43, 95% CI: 0.19–0.97, $p=0.04$). Προκειμένου να υπολογιστεί η ανεξάρτητη επίδραση αυτού του γονοτύπου στην τάση προς Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο (ACS), η προαναφερθείσα παρατήρηση επανεκτιμήθηκε στατιστικά εντασσόμενη σε μοντέλο λογαριθμικής εξάρτησης συμπεριλαμβανομένων, ως συμμεταβλητών, των ήδη καθιερωμένων παραγόντων κινδύνου για ΣΝ. Η προσέγγιση αυτή επιβεβαιώνει ότι ο γονότυπος $AA_{251}TT_{781}$ συνδέεται ανεξάρτητα με μειωμένο κίνδυνο Οξέος Στεφανιαίου

Συνδρόμου ACS (OR=0.34, 95% CI: 0.14–0.85, p=0.02). Παρ' όλα αυτά, οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν διατηρούν τη στατιστική τους σημαντικότητα όταν διορθώνονται για πολυπαραγοντική δοκιμασία, εντασσόμενες στην εφαρμογή της διόρθωσης κατά Bonferroni. Δεν ανιχνεύθηκε συσχέτιση γονοτύπου- φαινοτύπου ή γονοτύπου- απλοτύπου μεταξύ της εμφάνισης ή της σοβαρότητας Καρδιαγγειακής Νόσου και των μελετώμενων γονοτυπικών ποικιλιών, είτε πριν είτε μετά την προσαρμογή σχετικά με τους καθιερωμένους παράγοντες κινδύνου της ΣΝ. Κανένας άλλος συνδυασμός γονοτύπων δεν απέδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Όπως ήταν αναμενόμενο, όλοι οι συμβατικοί παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο –πλην της αρτηριακής υπέρτασης— ανευρέθηκαν σημαντικά πιο διαδεδομένοι στην CAD ομάδα σε αντίθεση με τη non-CAD ομάδα. Η πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση επιβεβαιώνει την κρατούσα άποψη ότι οι παράγοντες κινδύνου της ΣΝ όπως ο ΣΔ, το κάπνισμα, η δυσλιπιδαιμία ή το κληρονομικό ιστορικό, συνδέονται ισχυρά και ανεξάρτητα με την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου, ενώ καμία συσχέτιση δεν αποκαλύπτεται ανάμεσα στους ερευνούμενους γονοτύπους και τους συμβατικούς παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο.

Πίνακας 3 Συχνότητες αλληλομόρφων και τιμές χ^2 του Hardy-Weinberg equilibrium στους μελετώμενους υποπληθυσμούς

Παράμετρος	CAD		Controls		ACS		nonACS	
	f	HWE χ^2	f	HWE χ^2	f	HWE χ^2	f	HWE χ^2
251A	0.43	1.3	0.42	0.007	0.38	2.2	0.48	0.14
781C	0.62	0.6	0.65	3.2	0.65	0.26	0.6	2.6

f συχνότητα αλληλομόρφου, HWE Hardy-Weinberg equilibrium, ACS Acute Coronary Syndromes, CAD Coronary Artery Disease

Πίνακας 4 Συχνότητες γονοτύπων σε ασθενείς με CAD και υγιείς μάρτυρες

A251T	C781T	CAD	nsCAD	Odds ratio (95% Confidence interval)	Adjusted odds ratio (95% Confidence interval)	Adjusted <i>p</i>
AA	TT	33 (13.7)	21 (13.4)	0.85 (0.45-1.61)	0.86 (0.44-1.7)	0.7
AA	CT	7 (2.9)	7 (4.5)	0.54 (0.18-1.62)	0.48 (0.15-1.53)	0.2
AA	CC	1 (0.4)	0 (0)			0.5
AT	TT	4 (1.7)	2 (1.3)	1.08 (0.19-6.1)	0.84 (0.14-5.1)	0.9
AT	CT	98 (40.7)	53 (33.8)	1	1	
AT	CC	25 (10.4)	21 (13.4)	0.64 (0.33-1.26)	0.58 (0.29-1.17)	0.1
TT	TT	0 (0)	1 (0.6)			0.2
TT	CT	2 (0.8)	1 (0.6)	1.08 (0.1-12.2)	0.68 (0.05-8.6)	0.8
TT	CC	71 (29.5)	51 (32.5)	0.75 (0.46-1.23)	0.71 (0.42-1.19)	0.2
AA		41 (17)	28 (17.8)	0.88 (0.5-1.53)	0.89 (0.49-1.63)	0.7
AT		127 (52.7)	76 (48.4)	1	1	
TT		73 (30.3)	53 (33.8)	0.82 (0.52-1.3)	0.78 (0.49-1.26)	0.3
	CC	97 (40.2)	72 (45.9)	0.77 (0.5-1.2)	0.7 (0.44-1.11)	0.1
	CT	107 (44.4)	61 (38.9)	1	1	
	TT	37 (15.4)	24 (15.3)	0.88 (0.48-1.6)	0.89 (0.47-1.69)	0.7
Total		241	157			

Όλα τα OR και p-values που αφορούν γονοτύπους αναφέρονται σε σύγκριση με το πιο κοινό γονότυπο. **CAD** Coronary Artery Disease, **nsCAD** non significant CAD. Τα adjusted ORs έχουν διορθωθεί για ηλικία, φύλο, παρουσία ΑΥ, ΣΔ, δυσλιπιδαιμία, θετικό οικογενειακό ιστορικό και καπνιστικές συνήθειες

Πίνακας 5 Γονοτυπικές συχνότητες σε ασθενείς με Οξεία Στεφανιαία Σύνδρομο και ασθενείς χωρίς Οξεία Στεφανιαία Σύνδρομο

A251T	C781T	ACS n(%)	nonACS n (%)	Odds ratio (95% Confidence interval)	Adjusted Odds ratio (95% Confidence interval)	Adjusted P
AA	TT	11 (9.1)	22 (18.3)	0.43 (0.19-0.97)	0.34 (0.14-0.85)	0.02
AA	CT	3 (2.5)	4 (3.3)	0.64 (0.14-3)	0.48 (0.09-2.4)	0.4
AA	CC	0 (0)	1 (0.8)			0.1
AT	TT	3 (2.5)	1 (0.8)	2.5 (0.26-25.4)	2.45 (0.22-27.1)	0.5
AT	CT	53 (43.8)	45 (37.5)	1	1	
AT	CC	9 (7.4)	16 (13.3)	0.48 (0.19-1.18)	0.42 (0.16-1.1)	0.08
TT	TT	0 (0)	0 (0)			
TT	CT	2 (1.6)	0 (0)			0.2
TT	CC	40 (33.1)	31 (25.8)	1.1 (0.59-2.03)	1.03 (0.54-1.97)	0.9
AA		14 (11.6)	27 (22.5)	0.49 (0.24-1.03)	0.44 (0.2-0.98)	0.04
AT		65 (53.7)	62 (51.7)	1	1	
TT		42 (34.7)	31 (25.8)	1.29 (0.72-2.31)	1.2 (0.67-2.25)	0.5
	CC	49 (40.5)	48 (40)	0.86 (0.5-1.5)	0.8 (0.45-1.4)	0.4
	CT	58 (47.9)	49 (40.8)	1	1	
	TT	14 (11.6)	23 (19.2)	0.51 (0.24-1.1)	0.45 (0.2-1)	0.051
Total		121	120			

Όλα τα OR και p-values που αφορούν γονοτύπους αναφέρονται σε σύγκριση με το πιο κοινό γονότυπο. Τα adjusted ORs έχουν διορθωθεί για ηλικία, φύλο, παρουσία ΑΥ, ΣΔ, δυσλιπιδαιμία, θετικό οικογενειακό ιστορικό και καπνιστικές συνήθειες. **ACS** Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο

Πίνακας 6 Συχνότητες απλοτύπων σε ασθενείς και μάρτυρες

Haplotype	CAD	nsCAD	ACS	non ACS
A ²⁵¹ T ⁷⁸¹	0.36	0.33	0.33	0.39
A ²⁵¹ C ⁷⁸¹	0.07	0.09	0.05	0.09
T ²⁵¹ T ⁷⁸¹	0.01	0.02	0.02	0.005
T ²⁵¹ C ⁷⁸¹	0.55	0.56	0.59	0.51

CAD Coronary Artery Disease, **nsCAD** non significant CAD, **ACS** Acute Coronary Syndrome

IL-8 και Επαναστένωση: Όπως προαναφέρθηκε, στη μελέτη ενσωματώθηκαν 201 ασθενείς με Καρδιαγγειακή Νόσο (CAD), οι οποίοι εμφάνισαν συμπτώματα ή κλινικά σημεία ισχαιμίας μετά από PCI (μέση ηλικία 64 έτη, αναλογία ανδρών: γυναίκες 7.4:1). Κατόπιν αγγειογραφικής επανεκτίμησης, οι ασθενείς κατατάχθηκαν σε δύο επιμέρους ομάδες: Α. Ασθενείς (n = 73) με επαναστένωση εντός του ενδοπροθέματος (In-stent restenosis- ISR), Β. Ασθενείς (n = 128) χωρίς επαναστένωση του ενδοπροθέματος (Non-in-stent restenosis- non-ISR) και Γ. Υγιείς μάρτυρες (n = 147) χωρίς αγγειογραφικά στοιχεία CAD. (Πίνακας 7).

Στις ομάδες Α, Β και Γ αναλύθηκε η επικράτηση των πολυμορφισμών -251 A/T και 781 C/T του γονιδίου της IL-8 με τη χρήση του HWE. Οι γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες για τους υπο μελέτη συνδυασμούς παρουσιάζονται συνοπτικά στους Πίνακες 8 και 9.

Οι γονοτυπικές συχνότητες και των δύο πολυμορφισμών στην ομάδα των μαρτύρων έρχονται σε συμφωνία με τις προβλεπόμενες από το HWE. Αντιθέτως συχνότητες του πολυμορφισμού -251 A/T τόσο στην ομάδα ISR όσο και στην ομάδα non-ISR διαφέρουν από τις προβλεπόμενες από το HWE. Η προαναφερθείσα παρατήρηση σχετικά με την ισχυρή σύνδεση ανάμεσα στους 2 γονιδιακούς τύπους (251 A/T και 781 C/T), επιβεβαιώνεται κι εδώ από την ανάλυση της ανισοκατανομής σύνδεσης. Τέσσερις από τους εννέα συνδυασμένους γονότυπους αναφέρονται σε ποσοστό 90% του δείγματος ενώ η ανάλυση των απλοτύπων φανερώνει 3 προεξάρχοντες απλότυπους και τον λιγότερο διαδεδομένο $T_{251}T_{781}$ να αναλογεί σε λιγότερο από το 2% του γονιδιακού αποθέματος. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου υπολογίστηκαν τόσο για τους 4 απλότυπους όσο και για τους 9 συνδυασμένους γονοτύπους. Κατά τον υπολογισμό της επίδρασης καθενός ανεξάρτητα από τους μελετώμενους πολυμορφισμούς στην τάση προς επαναστένωση δεν αναδείχθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Η ανάλυση των συνδεδεμένων γονοτύπων αποκάλυψε μια στατιστικά σημαντική επικράτηση του $TT_{251}TT_{781}$ γονοτύπου (λαμβάνοντας ως στοιχειώδη παράγοντα κινδύνου το

γονότυπο $AT_{251}CT_{781}$) στην ομάδα ISR εν συγκρίσει με τις ομάδες non-ISR και non-CAD (odds ratio 1.2 95% confidence interval 1–1.9, $P = 0.049$). Μάλιστα, ο $TT_{251}TT_{781}$ γονότυπος ανιχνεύθηκε μόνο στην ομάδα ISR. Στη συνέχεια, ο γονότυπος $TT_{251}TT_{781}$ καθώς και οι καθιερωμένοι παράγοντες κινδύνου της ΣΝ συμπεριλήφθηκαν σε ανάλυση πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης, η οποία ανέδειξε τον παρόντα γονότυπο ως ανεξάρτητο προς τους λοιπούς παράγοντες κινδύνου όσον αφορά την προδιάθεση για ISR (διορθωμένη τιμή $p = 0.018$). Παρά όλα αυτά η επικράτηση του γονοτύπου $TT_{251}TT_{781}$ δεν διατηρεί στατιστική σημαντικότητα κατά την εφαρμογή διόρθωσης κατά Bonferroni για πολυπαραγοντική δοκιμασία (προσαρμοσμένη σημαντικότητα για 9 συμπεριλαμβανόμενες μεταβλητές: $p = 0.3$).

Συνεπώς ο απλότυπος $T_{251}T_{781}$ (h4) ήταν σημαντικά πιο διαδεδομένος στην ομάδα ISR σε σχέση με τη non-ISR και τη non-CAD. Χρησιμοποιώντας δε, ως στοιχειώδη κίνδυνο τον πιο συχνό απλότυπο $A_{251}T_{781}$ (h2), η επικράτηση του h4 στην ομάδα ISR εμφανίζει την ισχυρότερη στατιστική σημαντικότητα (odds ratio = 15.7; 95% confidence interval: 1.9–126, $P = 0.001$). Η τελευταία αυτή παρατήρηση διατηρεί τη στατιστική της σημαντικότητα μετά την εφαρμογή της διόρθωσης Bonferroni (διορθωμένη σημαντικότητα για 4 δοκιμαζόμενες μεταβλητές $p = 0.004$). Καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση φαινοτύπου-γονοτύπου και φαινοτύπου- απλοτύπου δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ των πολυμορφισμών και της κλινικής εμφάνισης ή αγγειογραφικής σοβαρότητας της καρδιαγγειακής νόσου. Καμία, επίσης, συσχέτιση μεταξύ συμβατικών παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο και κινδύνου για επαναστένωση δεν επιβεβαιώνεται, καθώς και μεταξύ των μελετώμενων γονοτύπων και των συμβατικών παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο.

Πίνακας 7 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με κλινικά επανεμφανιζόμενη ισχαιμία μετά από PCI

	ISR (n=73)	non ISR (n=128)	non CAD (n=147)
Age mean (±SEM)	64 (1.1)	64 (0.8)	62(1.1)
Male gender	67(93.2)	103 (80.5)	105 (71.4)
Hypertension	68 (91.8)	105 (82)	87 (59.2)
Diabetes	38 (52.1)	61 (47.7)	25 (17)
Dyslipidemia	73 (100)	126 (98.4)	99 (67.3)
Smoking	50 (68.5)	71 (55.5)	59 (40.1)
Positive family history	31 (42.5)	54 (42.2)	60 (40.8)
Median time (days) of follow-up CA post PCI	265 (130- 553)	285 (184- 602)	
Number of diseased vessels:			
1	15 (20.5)	36 (28.1)	
2	15 (20.5)	38 (29.7)	
3	43 (59)	54 (42.2)	
Clinical presentation:			
Unstable disease	15 (20.5)	29 (22.7)	
Stable disease	58 (79.5)	99 (77.3)	
Type of stent:			
BMS	39(53.4)	54 (42.2)	
DES	33(45.2)	67 (52.3)	
BMS and DES	1 (1.4)	8 (6.3)	

Οι τιμές αναφέρονται σε αριθμό υποκειμένων (%) ή σε μέσες τιμές (± SEM)

ISR In Stent Restenosis (επανάστένωση), **DES** Drug Eluted Stent (εμποτισμένα), **BMS** Bare Metal Stent (μεταλλικά μη εμποτισμένα)

Πίνακας 8 Γονοτυπικές συχνότητες σε ασθενείς και μάρτυρες

251 A/T	781 C/T	ISR n (%)	no ISR n (%)
AA	TT	7 (9.5)	23 (17.9)
AA	CT	3 (4.1)	2 (1.6)
AA	CC	0	2 (1.6)
AT	TT	1 (1.3)	1 (0.8)
AT	CT	32 (43.8)	59 (46.1)
AT	CC	15 (20.5)	19 (14.8)
TT	TT	3 (4.1)*	0*
TT	CT	0	0
TT	CC	12 (16.4)	22 (17.2)
AA		10 (13.7)	27 (21.1)
AT		48 (65.8)	79 (61.7)
TT		15 (20.5)	22 (17.2)
	CC	27 (37)	43 (33.6)
	CT	35 (47.9)	61 (47.7)
	TT	11 (15.1)	24 (18.8)
	Total	73	128

Οι τιμές αναφέρονται σε αριθμό υποκειμένων (%). **ISR** In Stent Restenosis (επαναστένωση)
 * $p < 0.001$ (χρησιμοποιώντας σαν «βασικό κίνδυνο» τον πιο κοινό γονότυπο ATCT)
 Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις οι p values ήταν κάτω από τον ουδό αποκλεισμού

Πίνακας 9 Συχνότητες απλοτύπων σε ασθενείς και μάρτυρες

Haplotype	ISR	no ISR
h1 A ₂₅₁ C ₇₈₁	0.133	0.1
h2 A ₂₅₁ T ₇₈₁	0.476	0.476
h3 T ₂₅₁ C ₇₈₁	0.332*	0.421*
h4 T ₂₅₁ T ₇₈₁	0.058**	0.004**
Total (n)	146	256

Το (n) αναφέρεται σε αριθμό αλληλομόρφων **ISR** In Stent Restenosis (επαναστένωση)
 * $p=0.07$ ** $p=0.007$

Κυτταροκαλλιέργειες: Η επίδραση του ARB λοζαρτάνη στην παραγωγή IL-8 και η έκφραση των υποδοχέων CXCR1/2 σε μονοκύτταρα THP-1 υπό την επίδραση AngII και LPS, συνοψίζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10 Επίδραση λοζαρτάνης στο φαινότυπο των υποδοχέων CXCR1/CXCR2 και την παραγωγή IL-8 από μονοκύτταρα THP-1 επωασμένα με LPS ή AngII

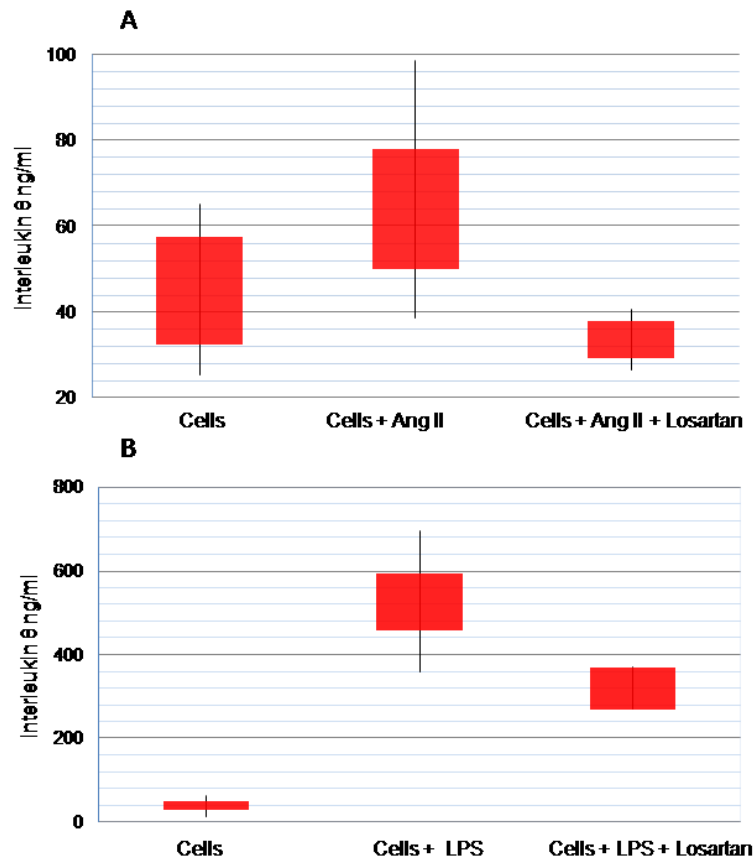
	LPS	Ang II	Losartan	Telmisartan	LPS+Losartan	Ang II+Losartan
CXCR1	↔	↔	↑	↑	↑	↑
CXCR2	↔	↔	↑	↔	↑	↑
IL 8	↑↑↑	↑↑	↓	ο	↑↑	↔

Βιοσύνθεση και έκκριση Ιντερλευκίνης 8: Η AngII προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της παραγωγής IL-8 από τα THP-1 μονοκύτταρα. Σε συγκεντρώσεις AngII 10μM επιτεύχθηκε μεγιστοποίηση του αποτελέσματος (45.2±12.5 ng/ml vs. 68.8±18.9 ng/ml, df=3, t = -6.96, p=0.006) (Εικόνα 9B). Το LPS προκάλεσε παρόμοιο αλλά ακόμη πιο έκδηλο φαινόμενο (40.3±9.5 ng/ml vs. 527±68.1 ng/ml, df=2, t = -14.2, p=0.005) (Εικόνα 9A). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και για τις δύο ουσίες στα χρονικά σημεία μεταξύ 12 και 48 ωρών μετά την επώαση.

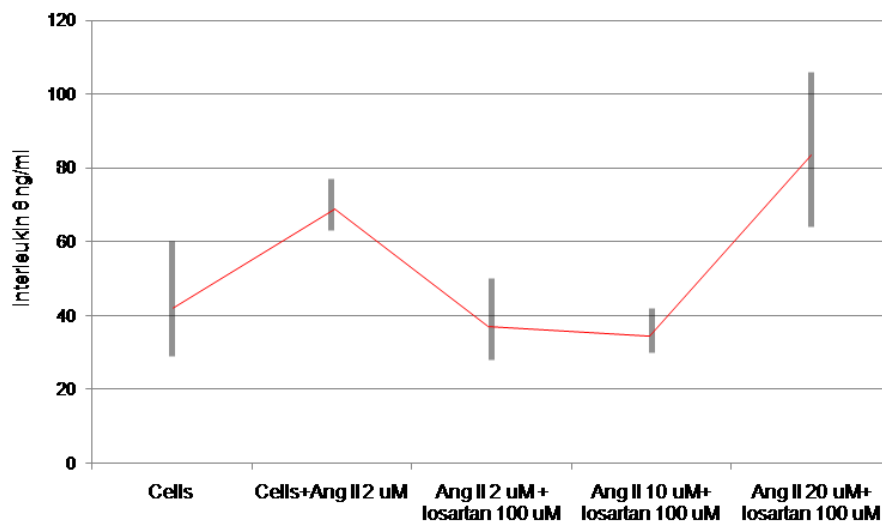
Η λοζαρτάνη ανέστειλε την επίδραση της AngII στην παραγωγή IL-8 από τα THP-1 μονοκύτταρα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Συγκέντρωση λοζαρτάνης 100 μM ανέστρεψε με επιτυχία την επίδραση της AngII σε συγκέντρωση 10 μM ή λιγότερο (76.7.8±12.6 ng/ml vs. 36.0±4 ng/ml, df=2, t = 8.2, p=0.015) (Εικόνα 10). Το φαινόμενο αναπαράγεται με τα ίδια αποτελέσματα, είτε τα μονοκύτταρα προεπωάζονται για 2 ώρες με λοζαρτάνη, είτε τίθενται ταυτόχρονα σε επώαση με λοζαρτάνη και AngII. Επιπρόσθετα, η λοζαρτάνη μείωσε σημαντικά την παραγωγή IL-8 την επαγόμενη από 10 ng/ml LPS (527±68 ng/ml vs. 320±20 ng/ml, df=2, t = 7.3, p = 0.018) (Εικόνα 9A). Κλείνοντας, η λοζαρτάνη μείωσε σημαντικά τη βασική

παραγωγή IL-8 από THP-1 κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία επώαση με AngII ή με LPS (naive) (58.3 ± 28.4 ng/ml vs. 28.4 ± 5.9 ng/ml, $df=4$, $t = 5.1$, $p=0.006$) (Εικόνα 11).

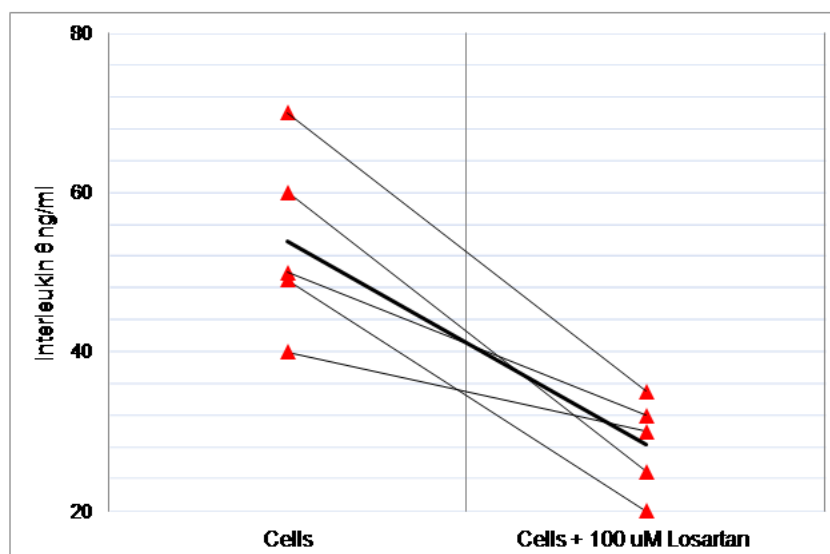
Φαινότυπος CXCR1/CXCR2: Ούτε η AngII ούτε το LPS επηρέασαν την ένταση φθορισμού των υποδοχέων CXCR1/CXCR2 στα THP-1 μονοκύτταρα. Η λοζαρτάνη, αντιθέτως, μετέβαλε σημαντικά το φαινότυπο των κυττάρων ως προς τους δύο υποδοχείς, είτε αυτά δεν είχαν επωαστεί με καμία ουσία (naive), είτε είχαν υποστεί προεπώαση με AngII ή LPS. Συγκέντρωση λοζαρτάνης ίση με 100 μ M προκάλεσε μικρή αλλά σταθερά ανιχνεύσιμη στατιστικά σημαντική αύξηση της έντασης φθορισμού των θετικών για CXCR1/CXCR2 υποδοχέων THP-1 μονοκυττάρων (59.1 ± 9.4 vs. 73.2 ± 11 , $df=8$, $t = -8.4$, $p < 0.0001$ και 67.2 ± 26.7 vs. 74 ± 29 , $df=8$, $t = -4.19$, $p = 0.003$ αντίστοιχα) (Εικόνες 12A και B). Τα κύτταρα επωάστηκαν επίσης και με το ARB τελμιζαρτάνη πριν υπολογιστεί η ένταση φθορισμού των CXCR1/CXCR2, προκειμένου να διαπιστωθεί όπως προαναφέρθηκε αν αυτό που παρατηρείται είναι class- αντί για drug- effect. Η τελμιζαρτάνη, ομοίως με τη λοζαρτάνη, αύξησε την πυκνότητα των θετικών για τον υποδοχέα CXCR1 κυττάρων (74 ± 27.5 vs. 105 ± 30.8 , $df=2$, $t = -9.6$, $p = 0.01$), ενώ δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη μεταβολή στην πυκνότητα των θετικών για τον υποδοχέα CXCR2 κυττάρων (82.3 ± 25.4 vs. 89.1 ± 23 , $df=2$, $t = -2.1$, $p = 0.17$).



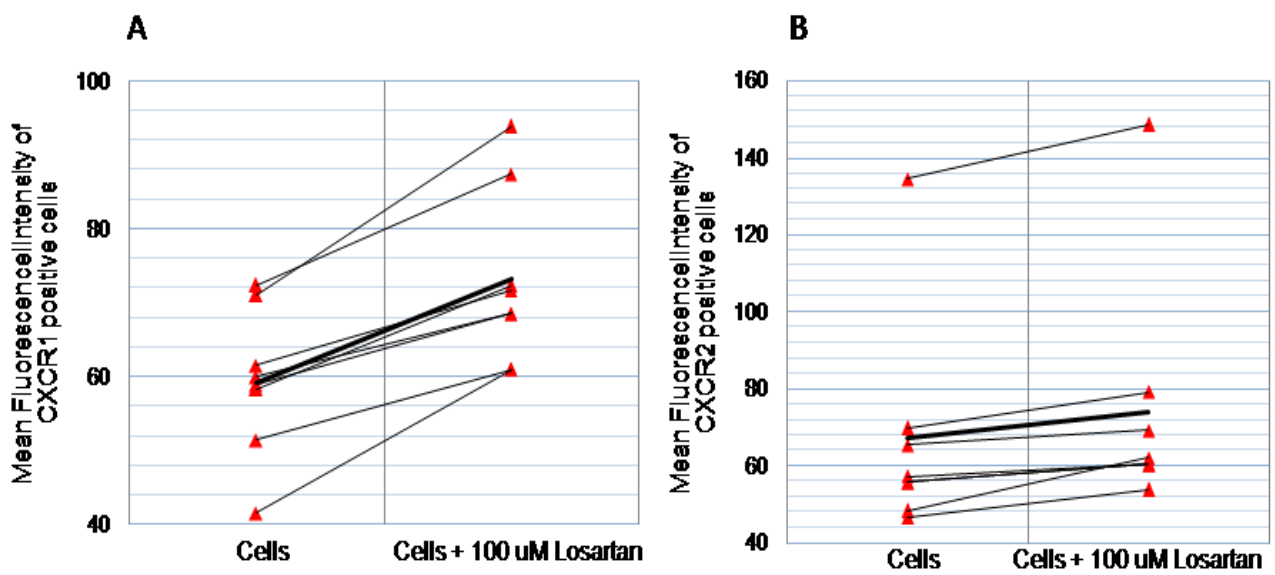
Εικόνα 9. Γραφικές παραστάσεις που παρουσιάζουν το εύρος τιμών και διάστημα αξιοπιστίας 95% των μέσων τιμών συγκέντρωσης IL-8 στο υπερκείμενο διάλυμα πριν και μετά την επώαση με LPS ή LPS με losartan **(A)** και AngII ή AngII με losartan **(B)**. Η κατηγορία Cells περιλαμβάνει τα κύτταρα στην αρχική «αθώα» κατάσταση. Τα παρόντα αποτελέσματα αναφέρονται στην επώαση με 10ng/mL LPS, 10 μM AngII και 100 μM losartan. Όλα τα αποτελέσματα ελήφθησαν 24 ώρες μετά την επώαση.



Εικόνα 10. Γραφική παράσταση της επίδρασης 100 μ M λοζαρτάνης στην παραγωγή IL-8 από THP-1 μονοκύτταρα διεγερμένα με ποικίλες συγκεντρώσεις AngII. Τα αποτελέσματα αναφέρονται στην ταυτόχρονη επώαση των παραγόντων. Η κατηγορία Cells περιλαμβάνει τα κύτταρα στην αρχική «αθώα» κατάσταση.



Εικόνα 11. Γραφική παράσταση της επίδρασης 100 μ M λοζαρτάνης στην παραγωγή IL-8 από THP-1 κύτταρα μη επωασμένα με LPS ή AngII. Κάθε λεπτή γραμμή αντιπροσωπεύει ένα μεμονωμένο πείραμα. Οι μέσες τιμές αντιπροσωπεύονται από την τονισμένη γραμμή.



Εικόνα 12. Γραφική παράσταση της επίδρασης 100μM λοζαρτάνης στην ένταση φθορισμού των υποδοχέων CXCR1 (A) και CXCR2 (B) (GeoMean) των THP-1 κυττάρων. Κάθε λεπτή γραμμή αντιπροσωπεύει ένα μεμονωμένο πείραμα. Οι μέσες τιμές αντιπροσωπεύονται από την τονισμένη γραμμή.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

IL-8 ΚΑΙ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

Η παρούσα μελέτη ασθενών- μαρτύρων είχε σαν στόχο την παροχή στοιχείων που θα πρότειναν τη συσχέτιση ανάμεσα σε δύο κοινούς πολυμορφισμούς του γονιδίου της IL-8 και της Καρδιαγγειακής Νόσου (CAD). Υπολογίστηκε η συσχέτιση φαινοτύπου- γονοτύπου τόσο στην κλινικά όσο και στην αγγειογραφικά τεκμηριωμένη CAD. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν πως ο κοινός γονότυπος 251AA και ιδιαίτερος ο συνδεδεμένος γονότυπος AA₂₅₁TT₇₈₁, συνδέονται με μειωμένο κίνδυνο Οξέος Στεφανιαίου Συνδρόμου (ACS) μεταξύ των ασθενών με CAD, ανεξάρτητα από τους δεδομένους παράγοντες κινδύνου Καρδιαγγειακής Νόσου. Η προστατευτική επίδραση του γονοτύπου AA₂₅₁TT₇₈₁ περιορίζεται κατά τα αποτελέσματα μόνο στους ασθενείς με ACSs. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου AA₂₅₁TT₇₈₁ και της αγγειογραφικά τεκμηριωμένης ΣΝ.

Το γεγονός πως η σταθερή CAD και τα ACSs παρουσιάζουν διαφορετικό παθολογοανατομικό υπόβαθρο πιθανώς να εξηγεί την παρατήρηση αυτή. Τα Οξέα Στεφανιαία Σύνδρομα αποτελούν αποτέλεσμα εξέγκωσης ή ρήξης τρωτών πλακών, οι οποίες μπορεί, προηγουμένως, να μην εξέθεταν σε σημαντικό κίνδυνο τον αυλό του στεφανιαίου αγγείου [59,61]. Οι επιρρεπείς σε εξέγκωση και ρήξη πλάκες χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ευμεγέθους λιπιδιακού πυρήνα εμπλουτισμένου με φλεγμονώδη κύτταρα και περιβαλλομένου από λεπτή ινώδη κάψα φτωχή σε περιεκτικότητα σε SMCs. Οι «ευαίσθητες» αυτές πλάκες φλεγμαίνουν εντόνως και οι διάφοροι φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές ενέχονται ισχυρά στη ρήξη της πλάκας [59,61]. Είναι, λοιπόν, ευνόητο, η γενετική ποικιλία που επηρεάζει την έκφραση φλεγμονωδών παραγόντων να δύναται να επηρεάσει και την τάση προς εμφάνιση ACS. Έχει ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι, τόσο οι πολυμορφισμοί -251A/T και 781C/T, όσο και ο απλότυπος AA₂₅₁TT₇₈₁ συνδέονται με

αυξημένη in vivo μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της IL-8 [46,47]. Μάλιστα, ο πολυμορφισμός -251A/T έχει συνδεθεί σε μελέτες ασθενών- μαρτύρων με διάφορα νεοπλάσματα και λοιμώδεις νόσους, όπως η RSV βρογχιολίτιδα, το άσθμα, το Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Ανεπάρκειας (ARDS) και η Νόσος Behcet [48-55]. Στην παρούσα μελέτη, ο AA₂₅₁TT₇₈₁ απλότυπος συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ACS μεταξύ των ασθενών με CAD. Το αποτέλεσμα αυτό μοιάζει απροσδόκητο εκ πρώτης όψεως, μιας και ο προαναφερθείς απλότυπος συνδέεται στη βιβλιογραφία με αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της IL-8, ενώ ποικίλες κλινικές έρευνες έχουν συνδέσει τα αυξημένα επίπεδα IL-8 στον ορρό με το αντίθετο αποτέλεσμα στην CAD καθώς και με κακή πρόγνωση στην κλινική πορεία του εμφραγματικού ασθενούς [43-45]. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει συγγραφική διαφωνία όσον αφορά την επίδραση των πολυμορφισμών -251A/T και 781C/T στις λοιμώδεις νόσους. Επιπλέον, το αντίκτυπο της παρουσίας και των δύο πολυμορφισμών στη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της IL-8 έχει κυρίως μελετηθεί σε κύτταρα αναπνευστικού επιθηλίου σε συνθήκες πνευμονικής νόσου. Η προκαλούμενη από τους δύο αυτούς λειτουργικούς πολυμορφισμούς απώλεια βιοχημικής ισορροπίας δεν έχει ακόμα υπολογιστεί στην αθηροσκλήρωση. Για παράδειγμα, η IL-8 δρα ως ισχυρός χημειοτακτικός παράγοντας για τα αγγειακά SMCs. 11,12 Οι πλούσιες σε SMCs ινώδεις κάψες, όμως, είναι λιγότερο ευάλωτες στη ρήξη [59,61]. Καθίσταται, λοιπόν αντιληπτό, πως το 251A αλληλόμορφο γονίδιο επιτείνει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της IL-8 συμβάλλοντας στη δημιουργία πλουσιότερων σε SMCs και συνεπώς σταθερότερων ινωδών καψών και προστατεύοντας, έτσι, τους CAD ασθενείς από ACSs. Αυτή δεν είναι η πρώτη μελέτη που υπαινίσσεται πιθανή θετική επίδραση της IL-8 στην ΣΝ. Οι Schömig et al. ανέφεραν πρόσφατα πως, στο Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου, η IL-8 συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων πρόδρομων κυττάρων που συντελούν στη γένεση νέων αγγείων και, επομένως, στην επακόλουθη βελτίωση της μυοκαρδιακής λειτουργίας [62]. Βεβαίως, η «ασύμφωνη» παρατήρηση που προκύπτει από την παρούσα μελέτη θα

μπορούσε να αποδοθεί απλά σε τεχνικά λάθη κατά τη διάρκεια της γονοτυπικής ανάλυσης ή σε «μπέρδεμα» των γονοτύπων. Εντούτοις, οι συχνότητες του υπό μελέτη απλότυπου είναι σύμφωνες προς αυτές που αναφέρονται σε προηγηθείσες έρευνες. Η συχνότητα (f) του 251A αλληλομόρφου που βρέθηκε στην ομάδα των μαρτύρων είναι συγκρίσιμη με εκείνη που έχει διαπιστωθεί σε προγενέστερες μελέτες Ελλήνων καθώς και λοιπών Βορείων και Νοτίων ευρωπαϊκών πληθυσμών [57,58,63-65]. Σε συμφωνία με τα παρόντα αποτελέσματα, το 781C είναι το προεξάρχον αλληλόμορφο και σε άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς αν και παρατηρείται σε ελαφρώς χαμηλότερη συχνότητα απ' ότι στην παρούσα ομάδα μαρτύρων [57,58,64,65]. Επιπρόσθετα, η παρουσία του -251A/T πολυμορφισμού επιβεβαιώθηκε και με τη διαδικασία άμεσης αλληλούχισης (sequencing) των προϊόντων της PCR. Για την περαιτέρω απαλοιφή πιθανών συστηματικών σφαλμάτων, οι ομάδες ασθενών και μαρτύρων επιλέχθηκαν με περισσή προσοχή. Η παρουσία ή μη CAD επιβεβαιώθηκε μόνο με στεφανιαία αγγειογραφία. Η ηλικία, ως βασικός παράγοντας κινδύνου στην CAD, αντιστοιχήθηκε κατά το πλείστον ανάμεσα στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων, ενώ από την ομάδα ελέγχου της μελέτης αποκλείστηκαν άτομα τα οποία δεν παρουσίαζαν τουλάχιστον έναν καθιερωμένο παράγοντα κινδύνου. Τελικά, μειώσαμε την πιθανότητα συστηματικού λάθους λόγω εθνικότητας, περιορίζοντας το δείγμα μας σε Καυκάσιους Έλληνες. Όλοι οι κλασσικοί προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με την ανάπτυξη Καρδιαγγειακής Νόσου, με εξαίρεση την αρτηριακή υπέρταση. Αυτό προφανώς οφείλεται στο γεγονός πως ο πιο συχνός, κρίσιμος για την συμμετοχή ακόμα και στην ομάδα των μαρτύρων, παράγοντας κινδύνου ήταν η υπέρταση.

Ένα ακόμα σημείο που πρέπει να τονιστεί είναι πως οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις δεν διατηρούν την στατιστική τους σημαντικότητα μετά την ανάλυση πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης. Παρά όλα αυτά, οι γονότυποι δεν μπορούν να θεωρηθούν ανεξάρτητες μεταβλητές, ιδίως λαμβάνοντας υπόψη γονιδιακούς τόπους

με ισχυρή ανισοκατανομή σύνδεσης. Η εφαρμογή ανάλυσης κατά Bonferroni σε αυτή την σύγκριση αυξάνει τις πιθανότητες διενέργειας στατιστικού λάθους τύπου II.

IL-8 ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΣΤΕΝΩΣΗ

Όσον αφορά τη μελέτη της επίδρασης των ίδιων πολυμορφισμών (-251A/T και 781C/T) στην επαναστένωση (ISR) μετά από Διαδερμική Στεφανιαία Παρέμβαση (PCI), είναι η πρώτη προσπάθεια συσχέτισής τους με την τάση προς αυτήν την κλινική οντότητα. Τα ευρήματα που προέκυψαν δηλώνουν θετική συσχέτιση μεταξύ ενός από τους όχι και τόσο συχνούς γονότυπους του γονιδίου της IL-8 και της ISR. Ο γονότυπος TT₂₅₁TT₇₈₁ ανευρέθηκε σημαντικά πιο διαδεδομένος στην ομάδα ISR, η οποία παρουσίασε επίσης μια σημαντικά υψηλότερη συχνότητα του απλοτύπου T₂₅₁T₇₈₁. Η τελευταία αυτή συσχέτιση σημειώθηκε παρά το μικρό μέγεθος του δείγματος και τη χαμηλή συχνότητα του γονότυπου TT₂₅₁TT₇₈₁. Αναμφίβολα, η παρατηρημένη αλληλεπίδραση φαινοτύπου/γονότυπου δε δύναται προς το παρόν να εφαρμοστεί σε κλινική και θεραπευτική συζήτηση λόγω των πολύ μικρών συχνοτήτων του εν λόγω γονότυπου. Είναι παρ' όλα αυτά, ενδεικτική της ανάμειξης των βιοχημικών διεργασιών που αφορούν την IL-8 στην παθογένεια της ISR.

Η πρόοδος στην τεχνολογία των ενδοπροθεμάτων (stents) έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της παρεμβατικής καρδιολογίας μειώνοντας τη συχνότητα εμφάνισης της επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική με μπαλόνι (balloon angioplasty). Δυστυχώς, όμως η ISR συνεχίζει να αποτελεί κυρίαρχο μειονέκτημα με ουσιώδεις κλινικές επιπλοκές [66]. Ποικίλοι παράγοντες συμβάλλουν στην ανάπτυξη ISR συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αναφέρονται στη βλάβη, στην επεμβατική μέθοδο, στον ασθενή αλλά και στο γενετικό υπόβαθρο [67,68,42]. Ο κυρίαρχος μηχανισμός ανάπτυξης ISR είναι ο πολλαπλασιασμός νεοενδοθηλιακών κυττάρων ενώ πολλαπλές έρευνες επιμένουν ισχυρά στο σημαντικό ρόλο της φλεγμονής στην περιοχή [67].

Διάφοροι ερευνητές έχουν υπολογίσει την επίδραση των γενετικών παραλλαγών, κυρίως μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) στην προδιάθεση του

ασθενούς για ISR [69-72]. Πρόσφατα, οι Shah et al. υπολόγισαν την επίδραση 39 υποψηφίων «αθηροσκληρωτικών» γονιδίων στην προδιάθεση για ISR σε 49 στεφανιαίους ασθενείς που είχαν αντιμετωπιστεί με BMS και σε 39 αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες. Κατέληξαν πως ένα γονίδιο ενεχόμενο στο φλεγμονώδες μονοπάτι των λευκοτριένιων, το ALOX5AP, το οποίο είχε προηγουμένως συσχετιστεί με την αθηροσκλήρωση των στεφανιαίων αγγείων, συνδέεται επίσης με την ISR [73]. Παρομοίως, οι Oguri et al. πραγματοποίησαν γονοτυπική ανάλυση για 142 πολυμορφισμούς σε 121 υποψήφια γονίδια, σε δείγμα πληθυσμού αποτελούμενο από 28 άτομα που παρουσίασαν ISR δύο ή περισσότερες φορές και από 499 άτομα χωρίς επαναστένωση. Κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο πολυμορφισμός -55C/T του γονιδίου της αποσυζευκτικής πρωτεΐνης 3 (UCP3) πιθανώς να συμβάλλει στον υπολογισμό του συνολικού κινδύνου υποτροπιαζόντων ISRs [74]. Στο πεδίο των φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, οι Miranda- Malpica et al. διερεύνησαν τη συσχέτιση μεταξύ της οικογένειας πολυμορφισμών της IL-1 και του κινδύνου για επαναστένωση μετά από τοποθέτηση stent σε 165 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε PCI και τοποθέτηση stent. Κατά την αρχική αγγειογραφία και την αγγειογραφία επανεξέτασης συλλέχθηκαν στοιχεία επαναστένωσης προκειμένου να συμπεριληφθούν στη μελέτη. Οι συγγραφείς καταλήγουν πως ο πολυμορφισμός B-511 του γονιδίου της IL-1 πιθανότατα να ενέχεται στην ανάπτυξη ISR [75]. Οι παραπάνω είναι μόνο μερικές από τις έρευνες που ασχολούνται με την επίδραση της γενετικής ποικιλότητας στην τάση προς επαναστένωση.

Ο ρόλος της IL-8 στα μονοπάτια της διαδικασίας της επαναστένωσης, πιο συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα. Οι Caixeta et al. για παράδειγμα, αναφέρουν αυξημένα επίπεδα IL-8 6 ώρες μετά την PCI και την τοποθέτηση stent στον ορρό των ασθενών που τελικά ανέπτυξαν ISR εν σχέση με εκείνους που δεν ανέπτυξαν [76]. Ομοίως, οι Qi et al. αναφέρουν πως τα αυξημένα επίπεδα IL-8 μετά από PCI αποτελούν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για νέα καρδιαγγειακά συμβάντα και επαναστένωση.

Μάλιστα, όσο υψηλότερα φτάνει η συγκέντρωση της IL-8 μετά την επέμβαση, τόσο λιγότερο πιθανή είναι η μετέπειτα ανεπίπλεκτη επιβίωση [77]. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και υποστηρίζουν τον καθοριστικό ρόλο της IL-8 στην ISR. Υπάρχουν, βέβαια, ορισμένοι περιορισμοί στη μελέτη οι οποίοι δύνανται να περιορίσουν την ισχύ των αποτελεσμάτων. Βασικό στοιχείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι το μικρό μέγεθος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε. Εξαιτίας αυτού ελαττώνεται σημαντικά η εγκυρότητα της μελέτης και ελαχιστοποιούνται οι προοπτικές απόδειξης αρνητικών συσχετισμών. Πρόκειται για ένα συχνό μειονέκτημα στις έρευνες που ασχολούνται με την επαναστένωση κυρίως λόγω της τοποθέτησης DES (φαρμακευτικά εμποτισμένα stent) και της επόμενης σημαντικής μείωσης της ISR. Επιπλέον, το γεγονός ότι ο πιο έγκυρος τρόπος διάγνωσης της ISR είναι η επανεξέταση με στεφανιογραφία, επεμβατική και δύσκολα χρησιμοποιούμενη για ερευνητικούς σκοπούς μέθοδος, μειώνει το μέγεθος του δείγματος. Προκειμένου να ξεπεραστούν τα παραπάνω μειονεκτήματα, συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα ασθενείς οι οποίοι παρουσίασαν κλινικές ενδείξεις επαναστένωσης ένα μήνα ως και 2 έτη έπειτα από επιτυχημένη PCI. Στην κλινικά καθοριζόμενη αυτή ομάδα, η συχνότητα της ISR ήταν σημαντικά υψηλότερη από τη συνολικά αναμενόμενη μετά από PCI. Μία ακόμα ασυμφωνία στα παρόντα αποτελέσματα είναι πως, αν η IL-8 εμπλεκόταν όντως στην αθηροσκληρωτική διαδικασία, θα περίμενε κανείς πιο εκσεσημασμένα αποτελέσματα από τους κυρίαρχους λειτουργικά γονότυπους -251AA και 781TT. Αντιθέτως, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν αφορούσαν μόνο το συνδυασμένο γονότυπο $TT_{251}TT_{781}$ και τον απλότυπο $T_{251}T_{781}$. Η προς τα πάνω ρύθμιση του αλληλομόρφου 781T συμφωνεί με τα παρόντα ευρήματα, ενώ η αντίστοιχη επίδραση του αλληλομόρφου -251A παρατηρείται μόνο σε ομοζυγωτία.

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να τονιστεί όπως και παραπάνω η ασυμφωνία που παρατηρείται στη βιβλιογραφία σχετικά με τις κλινικές επιπτώσεις των -251A/T και 781C/T στις φλεγμονώδεις νόσους. Επιπρόσθετα, η επιρροή των δύο αυτών

γενετικών ποικιλιών στη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της IL-8 έχει μεν μελετηθεί σε κύτταρα αναπνευστικού επιθηλίου σε μοντέλα αναπνευστικών νόσων αλλά όχι στο πεδίο της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας της αθηροσκλήρωσης.

Άλλος ένας περιορισμός της έρευνας είναι πως αφορά σε έναν μάλλον ετερογενή πληθυσμό. Οι ασθενείς που περιλαμβάνονται στη μελέτη έχουν αντιμετωπιστεί με την ένθεση είτε απλών είτε φαρμακευτικά εμποτισμένων stents, γεγονός που μπορεί να δρα συγχρητικά στην εξαγωγή αποτελεσμάτων, μιας και το παθοφυσιολογικό υπόβαθρο της επαναστένωσης μπορεί να παρουσιάζει διαφορές για την κάθε κατηγορία ενδοπρόθεσης [78]. Η διαπίστωση της ISR με διάφορους τρόπους στους μετέχοντες στη μελέτη (από ασυμπτωματικοί ασθενείς μέχρι και ασθενείς με Οξεία Στεφανιαία Σύνδρομα), μπορεί επίσης να αποτελέσει συγχρητικό παράγοντα, καθώς και το γεγονός της πιθανής παράβλεψης ασθενών με επαναστένωση λόγω της μη εμφάνισης σαφών συμπτωμάτων στις μη επεμβατικές τεχνικές επανεκτίμησης. Τέλος, μία ακόμη παρατήρηση που χρειάζεται να εξηγηθεί είναι η σημαντική απόκλιση των συχνοτήτων του αλληλομόρφου -251A/T από τις αναμενόμενες κατά το HWE σε αμφότερες τις ομάδες μελέτης ISR και non-ISR. Παράβαση του HWE μπορεί να οφείλεται σε λάθη κατά τη διαδικασία γονοτυπικής ανάλυσης, σε εθνική ποικιλότητα ή ακόμα και σε υπερεκλεκτική δειγματοληψία. Το πρωτόκολλο της δεδομένης έρευνας, βεβαίως περιλάμβανε διπλή γονοτυπική ανάλυση για το κάθε δείγμα DNA ενώ η εγκυρότητα της allele-specific PCR επιβεβαιώνεται με άμεσο sequencing τυχαία επιλεγμένων δειγμάτων. Καμία απόκλιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των αποτελεσμάτων της allele-specific PCR και της διαδικασίας του sequencing. Η εθνική ποικιλότητα απετράπη κατά το δυνατόν με την συμμετοχή μόνο Καυκάσιων στη μελέτη, αν και η τυχαιοποίηση του πληθυσμού περιορίστηκε σημαντικά λόγω των απαιτήτων κριτηρίων συμμετοχής (βαρεία καρδιαγγειακή νόσος, υποβληθείσα σε PCI με χαρακτηριστικά συμπτώματα στεφανιαίας ισχαιμίας σε δεδομένο χρονικό διάστημα). Η απόκλιση, λοιπόν του HWE θα μπορούσε να οφείλεται σε αυτό.

Συμπερασματικά, τόσο στην αρχόμενη CAD, τη ΣΝ, τα σταθερά και τα ασταθή Στεφανιαία Σύνδρομα, όσο και στην κλινικά και αγγειογραφικά τεκμηριούμενη Επαναστένωση μετά από Διαδερμική Στεφανιαία Παρέμβαση, ο ρόλος της IL-8 και των μελετώμενων γενετικών πολυμορφισμών είναι αδιαμφισβήτητος. Όσον αφορά τα ACS, ο πιο κοινός γονότυπος AA₂₅₁TT₇₈₁ σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισής τους, ανεξάρτητα από τους λοιπούς καθιερωμένους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Παρ' ότι η λειτουργική επίδραση του παραπάνω γονοτύπου της IL-8 στην εμφάνιση CAD καθώς και την καθαυτό ρήξη των αθηρωματικών πλακών δεν τεκμηριώνεται, είναι απαραίτητο να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος της εν λόγω χημοκίνης στα βιοχημικά μονοπάτια της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας. Επιπλέον, με αφορμή την ανάδειξη της αλληλεπίδρασης γονότυπου της IL-8 και της ανάπτυξης επαναστένωσης, η παραπάνω έρευνα κρίνεται σημαντικό να επεκταθεί και στο πεδίο της ISR για όλους τους τύπους ενδοπροθέσεων.

IL-8 ΚΑΙ THP-1 ΚΥΤΤΑΡΑ

Υπάρχουν επαρκή στοιχεία στη βιβλιογραφία, τα οποία υποστηρίζουν τις προφλεγμονώδεις και προ-αθηρογονικές ιδιότητες της Ang II. Για την ακρίβεια οι περισσότερες ευεργετικές πλειοτροπικές επιδράσεις από την αναστολή του RAS αποδίδονται στην αναστολή της αγγειακής δράσης που προκαλείται από την Ang II [80,81]. Τα περισσότερα δεδομένα σ' αυτό το πεδίο προκύπτουν από in vitro πειραματικά μοντέλα, που πολύ λίγο ομοιάζουν στις πραγματικές βιοχημικές συνθήκες, αλλά μπορούν επαρκώς να αναδείξουν μια μεμονωμένη κυτταρική αντίδραση σε ορισμένο ερέθισμα σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο [82].

Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να ερευνηθούν οι επιδράσεις της Ang II στο μονοπάτι της IL-8/CXCR1/CXCR2, χρησιμοποιήθηκαν THP-1 μονοκύτταρα. Η κυτταρική σειρά THP-1 είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο στη μελέτη της μονοκυτταρικής συμπεριφοράς εφόσον παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα ανθρώπινα μονοκύτταρα συμπεριλαμβανομένων της μορφολογίας και της έκφρασης μεμβρανικών υποδοχέων και κυτοκινών [83]. Σε αυτό το κυτταρικό

μοντέλο δείξαμε πως η Ang II αύξησε τη σύνθεση της IL-8 σε σημαντική αναλογία. Ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της Ang II (ARB), λοζαρτάνη, προκάλεσε αναστροφή του αποτελέσματος υποδηλώνοντας την συμμετοχή στη διαδικασία ενός διαμεσολαβούμενου από τον AT-1 υποδοχέα βιοχημικού μονοπατιού. Η λοζαρτάνη, επίσης, παρουσίασε τη δυνατότητα να εξασθενεί την προκληθείσα από την επίδραση LPS αύξηση της παραγωγής IL-8, αναδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο τις ευρύτερες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της. Οι Chen et al., σε συμφωνία προς τις προαναφερθείσες παρατηρήσεις, αναφέρουν ότι σε παρόμοιο πειραματικό μοντέλο η Ang II αύξησε τα επίπεδα της χημειοελκτικής για τα μονοκύτταρα πρωτεΐνης MCP-1, της IL-8 και του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF- α ενώ ρύθμιζε προς τα πάνω (up-regulation) την έκφραση των υποδοχέων CXCR1 και CXCR2 σε THP-1 μονοκύτταρα. Οι συγγραφείς επιπλέον αναφέρουν πως, η προεπεώαση με λοζαρτάνη, εξαφάνισε τα αποτελέσματα της δράσης της Ang II [84]. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι Schmeisser et al. [85], οι οποίοι επιπλέον παρατηρούν τη δόσοεξαρτώμενη καταστολή που προκαλεί η ραμιπριλάτη στην προκληθείσα από την Ang II προς τα πάνω ρύθμιση της έκφρασης IL-8 και MCP-1. Επομένως, γίνεται σαφής η συμφωνία σχετικά με την επίδραση της Ang II στην έκφραση της IL-8 από μονοκύτταρα. Μολαταύτα, η παρούσα ερευνητική εργασία, δείχνει ελάττωση και της βασικής συνθετικής δραστηριότητας των THP-1 κυττάρων σε IL-8 με την επίδραση της λοζαρτάνης, με παράλληλη αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της CXCR1 και CXCR2. Στην πράξη, η παρατήρηση αυτή έρχεται σε ρήξη με προηγηθείσες μελέτες που υποστηρίζουν την αύξηση τόσο της IL-8 όσο και των υποδοχέων της με την επίδραση Ang II και την παράλληλη μείωση της έκφρασης τους με την επίδραση της λοζαρτάνης [84,85]. Σε αυτή την μελέτη παρατηρείται αντίστροφο αποτέλεσμα από τη δράση της λοζαρτάνης στην έκφραση της IL-8 και των υποδοχέων CXCR1 και CXCR2. Δεν πρόκειται όμως για την πρώτη φορά που παρατηρείται ένα τέτοιο φαινόμενο. Αντίστροφη ρύθμιση των CXCR1 και/ή CXCR2 ως απόκριση στις μεταβολές της IL-8 έχει πρόσφατα αναφερθεί από πειραματικά in

vitro και in vivo μοντέλα [86,87], ενώ παρόμοια αποτελέσματα έχουν διαπιστωθεί και όσον αφορά την έκφραση του υποδοχέα CX3CR1 από THP-1 μονοκύτταρα με την επίδραση της λοζαρτάνης [79]. Το βιοχημικό μονοπάτι που οδηγεί στη ρύθμιση από τη λοζαρτάνη της έκφρασης των CXCR1/2 παραμένει ακόμη ασαφές. Οι Browning et al. παρέχουν άμεσες ενδείξεις ότι η αυτοκρινής παραγωγή IL-8 προκύπτει στα μονοκύτταρα από την επίδραση με IL-8 και ρυθμίζεται σε επίπεδο υποδοχέων. Επιπλέον οι ίδιοι συγγραφείς διατυπώνουν την υπόθεση πως, σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων όπως τα μονοκύτταρα του ανθρωπίνου περιφερικού αίματος (MNCs), η αυτοκρινής έκφραση της IL-8 επιτυγχάνεται με την εκλεκτική χρήση του CXCR1 υποδοχέα. Οι Samanta et al [17] παρέχουν δεδομένα σχετικά με τη δυναμική ρύθμιση από την IL-8 της έκφρασης των υποδοχέων της. Εφόσον η IL-8 ρυθμίζει τόσο τη δική της όσο και την έκφραση των υποδοχέων της CXCR1/2 μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα CXCR1, το αντίθετο αποτέλεσμα της επίδρασης της λοζαρτάνης στην έκφραση της χημοκίνης και των υποδοχέων της, μπορεί να οφείλεται στην ενεργοποίηση μονοπατιών αυτορρύθμισης. Προφανώς, από την παρούσα μελέτη δεν προέκυψαν δεδομένα υποστηρικτικά αυτής της υπόθεσης. Εντούτοις παρατηρήθηκε εντονότερη αύξηση της έντασης φθορισμού του CXCR1 κατά την επίδραση της λοζαρτάνης (ο CXCR1 αναφέρεται ως ο ισχυρότερα εμπλεκόμενος υποδοχέας στην αυτορρύθμιση της IL-8). Από την άλλη πλευρά, η παραπάνω θεωρία εξασθενεί λόγω του ανεπηρέαστου φαινοτύπου των THP-1 μονοκυττάρων όσον αφορά τους CXCR1/2 κατά τον δεκαπλασιασμό της συγκέντρωσης της IL-8 από LPS.

Συνοψίζοντας, κατά την παρούσα μελέτη, αναδείχθηκε η αύξηση της έκφρασης IL-8 από τα THP-1 μονοκύτταρα με την επίδραση AngII μέσω μονοπατιού του AT-1 υποδοχέα. Ο ARB λοζαρτάνη εξασθένησε την υπερέκφραση τόσο της AngII όσο και της IL-8 σε φλεγμονώδες περιβάλλον (επίδραση LPS) και προκάλεσε μία μικρή αλλά στατιστικά σημαντική ελάττωση της βασικής παραγωγής IL-8 από τα THP-1 μονοκύτταρα. Τελικά, η λοζαρτάνη παρήγαγε μια μικρή, στατιστικά σημαντική αύξηση

της έντασης φθορισμού των θετικών για CXCR1 και CXCR2 THP-1 μονοκυττάρων, η βιοχημική βάση της οποίας χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επεκτείνοντας την *in vitro* αυτή παρατήρηση σε *in vivo* μηχανισμούς, προτείνεται, η προκαλούμενη από την AngII παραγωγή IL-8, ως άλλη μία προαθηρογενετική επίδραση της AngII, η οποία μπορεί να αναχαιτιστεί αποτελεσματικά από το «μπλοκάρισμα» του υποδοχέα AT1.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), CVD atlas, http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/, 2012
2. Χριστόδουλος Ι. Στεφανάδης, «Παθήσεις της καρδιάς», Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης 2005
3. Stephen McPhee- Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, «Παθολογική Φυσιολογία», Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2000
4. Stavros Apostolakis, Konstantina Vogiatzi, Virginia Amanatidou, and Demetrios A. Spandidos: Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* (2009) 84, 353–360
5. Weber C. Chemokines in atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1896.
6. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5134–5138.
7. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2995–2998.
8. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993;92:1004–1008.
9. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:254–257.

10. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1897–1908.
11. Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1997–2008.
12. Barlic J, Murphy PM. Chemokine regulation of atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 2007;82:226–236.
13. Weber KS, von Hundelshausen P, Clark-Lewis I, Weber PC, Weber C. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol* 1999;29:700–712.
14. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640–644.
15. Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR. Cytokines and cardiovascular disease. *J Leukoc Biol* 2005;78:805–818.
16. Simonini A, Moscucci M, Muller DW, Bates ER, Pagani FD, Burdick MD et al. IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue. *Circulation* 2000;101:1519–1526.
17. Weber C, Weber KSC, Klier C, Gu H, Horuk R, Wank R et al. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in recruitment of monocytes and Th1-like/CD45RO⁺T cells. *Blood* 2001;97:1144–1146.
18. Remick GD. Interleukin-8. *Crit Care Med* 2005;33:s646–s647.
19. Waugh JJD, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6735–6741.
20. Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP 3rd, Toews GB et al. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest* 1990;86:1945–1953.

21. Gimbrone MA Jr, Obin MS, Brock AF, Luis EA, Hass PE, He'bert CA et al. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* 1989;246:1601–1603.
22. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991;253:1278–1280.
23. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of a complimentary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 1991;253:1280–1283.
24. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2002;2:123–128.
25. Schraufstatter IU, Chung J, Burger M. IL-8 activates endothelial CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L1094–L1103.
26. DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 1992;90:2123–2129.
27. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993;268:25568–25576.
28. Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis* 1996;127:263–271.
29. Apostolopoulos J, Davenport P, Tipping PG. Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1007–1012.
30. Liu Y, Hulte'n LM, Wiklund O. Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:317–323.

31. Dje N'Guessan P, Riediger F, Vardarova K, Scharf S, Eitel J, Opitz BS et al. Statins control oxidized LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:380–386.
32. Geisel J, Joˆdden V, Obeid R, Knapp JP, Bodis M, Herrmann W. Stimulatory effect of homocysteine on interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Clin hem Lab Med* 2003;41:1045–1048.
33. Ryoo SW, Kim DU, Won M, Chung KS, Jang YJ, Oh GT et al. Native LDL induces interleukin-8 expression via H₂O₂, p38 kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2004;62:185–193.
34. Ito T, Ikeda U, Yamamoto K, Shimada K. Regulation of interleukin-8 expression by HMG-CoA reductase inhibitors in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002;165:51–55.
35. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999;398:718–723.
36. Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL et al. IL-8. A mitogen and chemoattractant for smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;75:1–7.
37. Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation* 1999;99:420–426.
38. Rydberg EK, Salomonsson L, Hulthe´n LM, Nore´n K, Bondjers G, Wiklund O et al. Hypoxia increases 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 protein secretion in human macrophages. *Atherosclerosis* 2003;170:245–252.
39. Yang YY, Hu CJ, Chang SM, Tai TY, Leu SJ. Aspirin inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 expression in TNF-alpha stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 2004;174:207–213.

40. Kim HY, Kang YJ, Song IH, Choi HC, Kim HS. Upregulation of interleukin-8/CXCL8 in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2008;31:515–523.
41. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, Pache JC, Velebit V, Dayer JM et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2594–2599.
42. 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* 10:1– 78, 2003
43. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M, Ferrer J: Prognostic value of interleukin-8 as a predictor of heart failure in patients with myocardial infarction and percutaneous intervention. *Int J Cardiol* 111:158-60, 2006
44. Inoue T, Komoda H, Nonaka M, Kameda M, Uchida T, Node K: Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* [Epub ahead of print], 2007
45. Kanda T, Hirao Y, Oshima S, Yuasa K, Taniguchi K, Nagai R, Kobayashi I: Interleukin-8 as a sensitive marker of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 77:304-307, 1996
46. Hacking D, Knight JC, Rockett K, Brown H, Frampton J, Kwiatkowski DP, Hull J, Udalova IA: Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associated with respiratory syncytial virus disease-susceptibility. *Genes Immun* 5:274-282, 2004
47. Ohyauchi M, Imatani A, Yonechi M, Asano N, Miura A, Iijima K, Koike T, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T: The polymorphism interleukin 8 -251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population. *Gut* 54:330-335, 2005
48. Kamali-Sarvestani E, Aliparasti MR, Atefi S: Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma* 54:484-489, 2007

49. Ben Nasr H, Chahed K, Mestiri S, Bouaouina N, Snoussi K, Chouchane L: Association of IL-8 (-251)T/A polymorphism with susceptibility to and aggressiveness of nasopharyngeal carcinoma. *Hum Immunol* 68:761-769, 2007
50. Wei YS, Lan Y, Tang RG, Xu QQ, Huang Y, Nong HB, Huang WT : Single nucleotide polymorphism and haplotype association of the interleukin-8 gene with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Immunol* 125:309-317, 2007
51. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, Southgate C, Easton DF, Eeles RA, Howell WM: Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 62:3369-3372, 2002
52. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D: Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 55:1023-1027, 2000
53. Lee EB, Kim JY, Zhao J, Park MH, Song YW: Haplotype association of IL-8 gene with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 69:128-132, 2007
54. Hofner P, Balog A, Gyulai Z, Farkas G, Rakonczay Z, Takács T, Mándi Y: Polymorphism in the IL-8 gene, but not in the TLR4 gene, increases the severity of acute pancreatitis. *Pancreatology* 6:542-548, 2006
55. Kamali-Sarvestani E, Nikseresht AR, Aliparasti MR, Vessal M: IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients. *Neurosci Lett* 404:159-162, 2006
56. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF : A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215, 1988
57. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA: Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis *J Allergy Clin Immunol* 114:671-676, 2004

58. Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, Kwiatkowski D: Unusual Haplotypic Structure of IL8, a Susceptibility Locus for a Common Respiratory Virus. *Am J Hum Genet* 69:413–419, 2001
59. Grønholdt ML, Dalager-Pedersen S, Falk E: Coronary atherosclerosis: determinants of plaque rupture. *Eur Heart J* 19: Suppl C:C24-29, 1998
60. Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Finn AV, Gold HK: Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart* 90:1385–1391, 2004
61. Henriques de Gouveia R, van der Wal AC, van der Loos CM, Becker AE: Sudden unexpected death in young adults. Discrepancies between initiation of acute plaque complications and the onset of acute coronary death. *Eur Heart J* 23:1433-1440, 2002
62. Schömig K, Busch G, Steppich B, Sepp D, Kaufmann J, Stein A, Schömig A, Ott I: Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *Eur Heart J*;27:1032-1037, 2006
63. Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Felekouras E, Nikiteas N, Karakitsos P, Panoussopoulos D, Lazaris ACh, Patsouris E, Bramis J, Gazouli M: Relation between common polymorphisms in genes related to inflammatory response and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 12: 5037-5043, 2006
64. Sánchez E, Sabio JM, Callejas JL, de Ramón E, Garcia-Portales R, García-Hernández FJ, Jiménez-Alonso J, González-Escribano MF, Martín J, Koeleman BP: Association study of genetic variants of pro-inflammatory chemokine and cytokine genes in systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet* 7: 48, 2006
65. Puthothu B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A: Impact of IL8 and IL8-Receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clin Mol Allergy*, 4:2, 2006

66. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN (2007) Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinform* 8:428.
67. Hoffmann R, Mintz GS (2000) Coronary in-stent restenosis-predictors, treatment and prevention. *Eur Heart J* 21:1739–1749.
68. Mitra AK, Agrawal DK (2006) In stent restenosis: bane of the stent era. *J Clin Pathol* 59:232–239.
69. Petrovic D, Peterlin B (2005) Genetic markers of restenosis after coronary angioplasty and after stent implantation. *Med Sci Monit* 11:RA127–RA135
70. Kastrati A, Koch W, Berger PB et al (2000) Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 36:2168–2173.
71. Humphries S, Bauters C, Meirhaeghe A, Luong L, Bertrand M, Amouyel P (2002) The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. *Eur Heart J* 23:721–725.
72. Ferrero V, Ribichini F, Matullo G et al (2003) Estrogen receptoralpha polymorphisms and angiographic outcome after coronary artery stenting. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2223–2228.
73. Shah SH, Hauser ER, Crosslin D et al (2008) ALOX5AP variants are associated with in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis* (Epub ahead of print)
74. Oguri M, Kato K, Hibino T et al (2007) Identification of a polymorphism of UCP3 associated with recurrent in-stent restenosis of coronary arteries. *Int J Mol Med* 20:533–538
75. Miranda-Malpica E, Martínez-Rios MA, Fragoso JM et al (2008) The interleukin 1B-511 polymorphism is associated with the risk of developing restenosis after coronary stenting in Mexican patients. *Hum Immunol* 69:116–121.

76. Caixeta AM, Brito FS Jr, Costa MA, Serrano CV Jr, Petriz JL, Da Luz PL (2007) Enhanced inflammatory response to coronary stenting marks the development of clinically relevant restenosis. *Catheter Cardiovasc Interv* 69:500–507.
77. Qi X, Li S, Li J (2003) The prognostic value of IL-8 for cardiac events and restenosis in patients with coronary heart diseases after percutaneous coronary intervention. *Jpn Heart J* 44:623–632.
78. Gogo PB Jr, Schneider DJ, Watkins MW, Terrien EF, Sobel BE, Dauerman HL (2005) Systemic inflammation after drug-eluting stent placement. *J Thromb Thrombolysis* 19:87–92.
79. Apostolakis S, Krambovitis E, Vlata Z, Kochiadakis GE, Baritaki S, Spandidos DA. CX3CR1 receptor is up-regulated in monocytes of coronary artery diseased patients: impact of pre-inflammatory stimuli and renin-angiotensin system modulators. *Thromb Res* 2007; 121: 387-95.
80. Koh KK, Ahn JY, Han SH, Kim DS, Jin DK, Kim HS, Shin MS, Ahn TH, Choi IS, Shin EK. Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 905-10.
81. Sierra C, de la Sierra A. Antihypertensive, cardiovascular, and pleiotropic effects of angiotensin-receptor blockers. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005; 14: 435-41.
82. Devlin RB, Frampton ML, Ghio AJ. In vitro studies: what is their role in toxicology? *Exp Toxicol Pathol* 2005; 57 Suppl 1:183-8.
83. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980;26:171-6
84. Chen M, Li Y, Yang T, Wang Y, Bai Y, Xie X. ADMA induces monocyte adhesion via activation of chemokine receptors in cultured THP-1 cells. *Cytokine* 2008; 43: 149-59.

85. Schmeisser A, Soehnlein O, Illmer T, Lorenz HM, Eskafi S, Roerick O, Gabler C, Strasser R, Daniel WG, Garlich CD. ACE inhibition lowers angiotensin II-induced chemokine expression by reduction of NF-kappaB activity and AT1 receptor expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 532-40.
86. Chishti AD, Dark JH, Kesteven P, Powell H, Snowden C, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV. Expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 1162-6.
87. Gessler P, Pfenninger J, Pfammatter JP, Carrel T, Baenziger O, Dahinden C. Plasma levels of interleukin-8 and expression of interleukin-8 receptors on circulating neutrophils and monocytes after cardiopulmonary bypass in children. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 718-25.
88. Browning DD, Diehl WC, Hsu MH, Schraufstatter IU, Ye RD. Autocrine regulation of interleukin-8 production in human monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1129-36.
89. Samanta AK, Oppenheim JJ, Matsushima K. Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem* 1990; 265: 183-9.

Interleukin 8 and Susceptibility to Coronary Artery Disease: a Population Genetics Perspective.

Konstantina Vogiatzi · Stavros Apostolakis ·
Vassilios Voudris · Sophia Thomopoulou ·
Georgios E. Kochiadakis · Demetrios A. Spandidos

Received: 19 December 2007 / Accepted: 26 February 2008 / Published online: 2 April 2008
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract

Introduction Interleukin 8 is a strong chemoattractant factor for neutrophils and T lymphocytes. We investigated the potential influence of two common polymorphisms of the interleukin-8 gene, -251A/T, and 781C/T on susceptibility to coronary artery disease.

Materials and Methods The hypothesis was tested by screening for the prevalence of the above polymorphisms in 241 angiographically diagnosed coronary artery disease patients compared to 157 selected controls with negative coronary angiography.

Results and Discussion We found no significant differences between cases and controls concerning the allelic and genotypic frequencies of both the studied polymorphisms. Nevertheless, a statistically significant lower frequency of the AA containing genotypes was observed in cases presenting with acute coronary syndromes compared to asymptomatic subjects or patients with stable coronary artery disease (OR=0.44, 95%CI: 0.2–0.98, $p=0.04$). The strongest statistical significance was observed in the AA₂₅₁TT₇₈₁ combined genotype (OR=0.34, 95%CI: 0.14–0.85, $p=0.02$).

Conclusion Our results suggest that the genetic diversity of the interleukin-8 gene influences the clinical manifestation of CAD.

Keywords Coronary artery disease · acute coronary syndromes · interleukin-8 · polymorphisms

Introduction

Atherosclerosis is a complex multifactorial condition associated with numerous environmental risk factors that interact with the genetic background of the individual. The correlation between atherosclerosis and inflammation is well established [1, 2].

Interleukin 8 (IL-8) or CXCL8 is the prototype member of the CXC chemokine family. It is a strong chemoattractant for neutrophils and T-lymphocytes and is produced by a wide range of cell types in response to various inflammatory stimuli [3]. IL-8 interacts with target cells by firm binding to its receptors, CXCR1 and CXCR2 [3]. IL-8 is commonly known as a strong mediator of inflammation. It has been implicated in the biochemical pathways involved in a wide range of inflammatory diseases, such as acute respiratory distress syndrome, severe acute pancreatitis, bronchial asthma, juvenile idiopathic arthritis, *Helicobacter pylori*-induced gastritis, and atherosclerosis [4–9].

The fact that IL-8 is implicated in atherogenesis is well established [3]. Macrophages and foam cells from human atherosclerotic lesions have been shown to produce IL-8, and macrophages from advanced lesions in mice strongly express CXCR2 [10]. Furthermore, smooth muscle cells (SMCs) of atherosclerotic lesions proliferate and migrate to the intima of the vessel wall in response to IL-8 [11, 12]. In addition to in vitro studies, increased serum levels of IL-

K. Vogiatzi · S. Apostolakis · D. A. Spandidos (✉)
Laboratory of Clinical Virology, Faculty of Medicine,
University of Crete,
Heraklion,
Crete, Greece
e-mail: spandidos@spandidos.gr

V. Voudris · S. Thomopoulou
Department of Cardiology, Onassis Cardiac Surgery Centre,
Athens, Greece

G. E. Kochiadakis
Department of Cardiology, University Hospital of Crete,
Heraklion,
Crete, Greece

8 have been associated with coronary artery disease (CAD) and adverse outcome after acute myocardial infarction [13–15].

Several polymorphisms have been detected in the IL-8 gene, and a common polymorphism in the –251 position (251A/T, rs4073) of the promoter region has been associated with its transcriptional activity [16, 17]. The 251A allele in a homozygous state has been associated with increased expression of the IL-8 gene. Another common polymorphism in position 781 of the IL-8 gene (781C/T, rs2227306) has been associated with altered transcription levels of IL-8. In fact, the common haplotype A²⁵¹T⁷⁸¹ has been found to have the maximum upregulating effect on IL-8 expression [16]. Both polymorphisms have been evaluated in a wide range of clinical settings and have been proved to affect susceptibility to a large number of inflammatory diseases, as well as disease severity and clinical progression [18–25].

In the present study, we assessed the impact of IL-8 on CAD from a population genetics perspective. We evaluated the effect of the –251A/T and 781C/T common polymorphisms of the IL-8 gene on the susceptibility, angiographic severity, and clinical presentation of CAD by genotyping patients with angiographically established CAD and aged-matched disease-free controls.

Materials and Methods

Patients and Controls

Three hundred CAD patients (CAD group) and 189 control subjects (nsCAD group) were initially recruited from two independent cardiology departments over a 2-year recruitment period. CAD was defined as angiographic evidence of at least one epicardial coronary artery with more than 70% stenosis. The control group was composed of age-matched subjects who had undergone a coronary angiography in the same recruitment period as the CAD patients, without angiographic evidence of CAD. Controls selected also had at least one conventional predisposing factor of CAD (besides age and gender). Fifty-nine patients and 29 controls were excluded from the study due to incomplete clinical data or failure of the genotyping process. From the CAD patients, 241 (median age 65, male:female ratio 4.4) were finally included in the genotype–phenotype association study along with 157 controls (median age 65, male:female ratio 2.5).

All the subjects enrolled were Caucasian Greeks. Informed consent was obtained from all the individuals that participated in the study. The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the ethical committee of University Hospital of Crete and Onassis Cardiac Surgery Centre.

Clinical Characteristics

Clinical characteristics, including age, sex, smoking habits, history of diabetes mellitus, dyslipidemia, hypertension, family history, and clinical presentation of CAD, were correlated with the studied polymorphisms (Table 1). Smoking was defined as a current or prior history of tobacco use. Diabetes was defined as a fasting blood glucose level greater than 126 mg/dl, or treatment with dietary modification, oral hypoglycemic agents, or insulin at the time of the study. Hypertension was defined as systolic blood pressure greater than 140 mmHg and/or diastolic pressure greater than 90 mmHg in at least three distinct measurements or in cases in which such a diagnosis had been made in the past and the patient was being treated with medication or lifestyle modification. To define dyslipidemia in patients with unknown coronary status before the study, cutoff levels for the general population were applied. For patients with CAD established before the study, dyslipidemia was defined as treatment with lipid-lowering medication, 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 [26]. Parental history of myocardial infarction was considered as positive family history. The presenting symptom of CAD was also recorded, and the study participants were further divided into patients presenting with an acute coronary syndrome (ACS group, $n=121$) and patients with stable disease (non-ACS group, $n=120$).

Table 1 Clinical and Epidemiological Characteristics of Patients and Controls

Characteristic	CAD n(%)	nsCAD n(%)
Age	64±0.7	63±1
Male gender	197 (81.7)	112 (71.3)*
Diabetes	86 (35.7)	32 (20.4)*
Hypertension	68 (28.2)	62 (39.5)
Dyslipidemia	193 (77.5)	103 (65.6)*
Smoking	121 (50.2)	53 (33.8)*
Positive family history	120 (49.8)	59 (37.6)*
Number of diseased vessels		
1	95 (39.4)	
2	55 (22.8)	
3	91 (37.8)	
Acute coronary syndrome	121 (50.2)	–
Acute myocardial infarction	58 (24.1)	
Total	241	157

Values indicate the number of patients (%). Age is expressed as the mean±SEM

CAD Coronary artery disease, nsCAD nonsignificant coronary artery disease

* $p<0.05$

Genotyping

Genomic DNA was extracted from 10 ml ethylenediaminetetraacetic acid-treated venous blood samples using the standard phenol/chloroform protocol [27]. All blood samples were taken before catheterization. DNA purity was assessed by a UV/VIS spectrophotometer evaluating the A260/A280 ratio.

Genotyping for the 251A/T polymorphism was performed using allele-specific polymerase chain reaction (PCR) as previously described [28]. Results were verified by direct sequencing of the PCR product. PCR/restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was performed for the detection of the variation 781C/T. Initially, PCR was performed to frame the polymorphic region using primers and conditions as previously described. PCR products were further subjected to digestion with 1 U of EcoRI endonuclease [29]. Representative DNA electrophoretic patterns and sequencing results are presented in Fig. 1.

Statistical Analysis

Genotype distributions for each polymorphism were first compared to values predicted by the Hardy–Weinberg equilibrium through χ^2 analysis. Haplotypes were calculated, and linkage disequilibrium was measured using the classic statistic, disequilibrium coefficient.

The correlation of each of the studied polymorphisms to clinical parameters was first evaluated by χ^2 analysis with 2 *df*. The extent of each genotype's association with the disease was initially estimated by Pearson's χ^2 analysis or the Fisher exact test where indicated (expected frequencies <5). Adjustment for the patients' conventional risk factors (age, gender, smoking status, diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia, and family history) was performed by including these covariates in a logistic regression model. To provide separate odds ratios (ORs) for each genotype, the most common genotype was considered as the reference group. Both adjusted and unadjusted ORs are reported in the presence of significant results or border line significances. Using our sample size, the study had a power of 88% to detect a 15% difference in allele frequencies, assuming a 20% prevalence of the rare allele in the control group and a type I error probability of 0.05.

Numerical values are expressed as the mean±SEM, and differences between means were compared by the two-tailed unpaired Student's *t* test. In all cases, *p* values less than 0.05 were considered to be statistically significant. Analyses were performed using SPSSv10 (SPSS Inc., Chicago IL, USA). All significant associations were further corrected for multiple testing by applying Bonferroni correction. The level of significance was adjusted by being divided by the number of tested variables (*n*). Significant

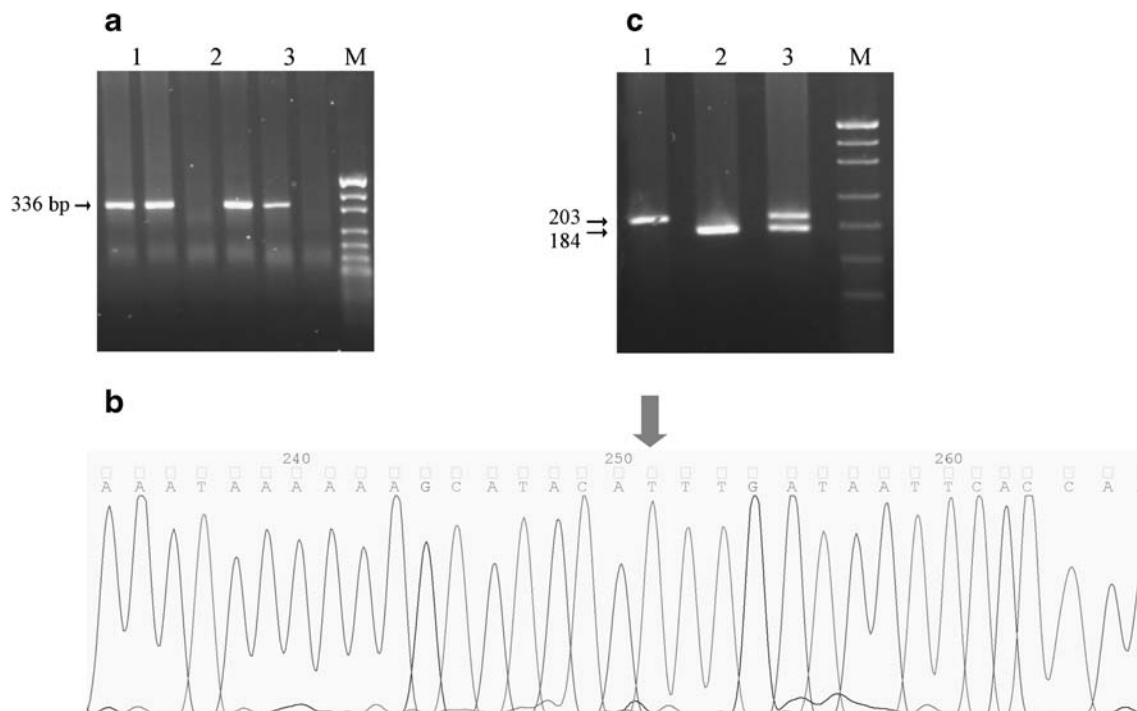


Fig. 1 **a** Representative electrophoretic patterns visualized in 2% agarose gel of a 251A/T heterozygote (1), a 251T homozygote (2), and a 251A homozygote (3). **b** 251TT genotype confirmed by direct sequencing of the 336 bp PCR product. The polymorphic site is indicated by the grey arrow. **c** Cleavage of 203 bp PCR product

framing the 781C/T polymorphic site by the EcoRI restriction endonuclease. DNA band patterns of a 781T homozygote (1), a 781C homozygote (2), and a heterozygote (3). *M* represents a puc19 DNA marker

Table II Allele Frequencies and χ^2 Values of Hardy–Weinberg Equilibrium in the Studied Subpopulation

Allele	CAD		Controls		ACS		nonACS	
	<i>f</i>	HWE χ^2	<i>f</i>	HWE χ^2	<i>f</i>	HWE χ^2	<i>f</i>	HWE χ^2
251A	0.43	1.3	0.42	0.007	0.38	2.2	0.48	0.14
781C	0.62	0.6	0.65	3.2	0.65	0.26	0.6	2.6

f Allele frequency, *HWE* Hardy–Weinberg equilibrium, *CAD* coronary artery disease, *ACS* acute coronary syndrome

results were considered those presenting *p* values < 0.005 in the comparison of combined genotypes (*n*=9) and *p* < 0.017 in the testing of individual genotypes (*n*=3). Uncorrected *p* values are presented, and significances after the application of Bonferroni correction are reevaluated and discussed.

Results

The prevalence of 251A/T and 781C/T polymorphisms of the IL-8 gene was analyzed in 241 patients with CAD of various severity and in 157 controls. The genotypic and allelic frequencies for all the studied variations are shown in Tables II, III, and IV. Genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy–Weinberg equilibrium in all groups (Table II), and linkage disequilibrium analysis indicated a strong association between the two loci (*D'*=0.93). Genotyping revealed four common combined genotypes (of the nine possible), accounting for more than 90% of the population. Haplotype analysis revealed three predominant haplotypes and the extremely

rare T²⁵¹T⁷⁸¹ haplotype, accounting for less than 1% of the population gene pool (Table V).

A predominance of 251A allele homozygotes was observed in the non-ACS group compared to the ACS group (OR=0.49, 95% CI: 0.24–1.0, *p*=0.07). The difference was enhanced beyond the level of statistical significance when logistic regression was applied (OR=0.44, 95% CI: 0.2–0.98, *p*=0.04). A predominance of the AA₂₅₁TT₇₈₁ combined genotype was also noted in the non-ACS group (OR=0.43, 95% CI: 0.19–0.97, *p*=0.04). To assess the independent effect of this genotype on susceptibility to ACS, the latter observation was reevaluated in a logistic regression model including, as covariates, established risk factors of cardiovascular disease. This approach confirmed that the AA₂₅₁TT₇₈₁ genotype is independently associated with a reduced risk of ACS (OR=0.34, 95% CI: 0.14–0.85, *p*=0.02). However, none of the above observations retain their statistical significance when corrected for multiple testing by the application of Bonferroni correction.

No phenotype–genotype or phenotype–haplotype association was detected between the prevalence or severity of

Table III Genotype Frequencies in CAD Patients and Controls

A251T	C781T	CAD	nsCAD	Odds ratio (95% confidence interval)	Adjusted odds ratio (95% confidence interval)	Adjusted <i>p</i>
AA	TT	33 (13.7)	21 (13.4)	0.85 (0.45–1.61)	0.86 (0.44–1.7)	0.7
AA	CT	7 (2.9)	7 (4.5)	0.54 (0.18–1.62)	0.48 (0.15–1.53)	0.2
AA	CC	1 (0.4)	0 (0)			0.5
AT	TT	4 (1.7)	2 (1.3)	1.08 (0.19–6.1)	0.84 (0.14–5.1)	0.9
AT	CT	98 (40.7)	53 (33.8)	1	1	
AT	CC	25 (10.4)	21 (13.4)	0.64 (0.33–1.26)	0.58 (0.29–1.17)	0.1
TT	TT	0 (0)	1 (0.6)			0.2
TT	CT	2 (0.8)	1 (0.6)	1.08 (0.1–12.2)	0.68 (0.05–8.6)	0.8
TT	CC	71 (29.5)	51 (32.5)	0.75 (0.46–1.23)	0.71 (0.42–1.19)	0.2
AA		41 (17)	28 (17.8)	0.88 (0.5–1.53)	0.89 (0.49–1.63)	0.7
AT		127 (52.7)	76 (48.4)	1	1	
TT		73 (30.3)	53 (33.8)	0.82 (0.52–1.3)	0.78 (0.49–1.26)	0.3
	CC	97 (40.2)	72 (45.9)	0.77 (0.5–1.2)	0.7 (0.44–1.11)	0.1
	CT	107 (44.4)	61 (38.9)	1	1	
	TT	37 (15.4)	24 (15.3)	0.88 (0.48–1.6)	0.89 (0.47–1.69)	0.7
Total		241	157			

All OR and *p* values concerning genotypes refer to a comparison with the most common genotype. Adjusted ORs have been corrected for age, gender, presence of hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia, positive family history and smoking habits
CAD Coronary artery disease, *nsCAD* nonsignificant coronary artery disease

Table IV Genotype Frequencies in ACS and Non-ACS Patients

A251T	C781T	ACS n(%)	nonACS n (%)	Odds ratio (95% Confidence interval)	Adjusted Odds ratio (95% Confidence interval)	Adjusted P
AA	TT	11 (9.1)	22 (18.3)	0.43 (0.19–0.97)	0.34 (0.14–0.85)	0.02
AA	CT	3 (2.5)	4 (3.3)	0.64 (0.14–3)	0.48 (0.09–2.4)	0.4
AA	CC	0 (0)	1 (0.8)			0.1
AT	TT	3 (2.5)	1 (0.8)	2.5 (0.26–25.4)	2.45 (0.22–27.1)	0.5
AT	CT	53 (43.8)	45 (37.5)	1	1	
AT	CC	9 (7.4)	16 (13.3)	0.48 (0.19–1.18)	0.42 (0.16–1.1)	0.08
TT	TT	0 (0)	0 (0)			
TT	CT	2 (1.6)	0 (0)			0.2
TT	CC	40 (33.1)	31 (25.8)	1.1 (0.59–2.03)	1.03 (0.54–1.97)	0.9
AA		14 (11.6)	27 (22.5)	0.49 (0.24–1.03)	0.44 (0.2–0.98)	0.04
AT		65 (53.7)	62 (51.7)	1	1	
TT		42 (34.7)	31 (25.8)	1.29 (0.72–2.31)	1.2 (0.67–2.25)	0.5
	CC	49 (40.5)	48 (40)	0.86 (0.5–1.5)	0.8 (0.45–1.4)	0.4
	CT	58 (47.9)	49 (40.8)	1	1	
	TT	14 (11.6)	23 (19.2)	0.51 (0.24–1.1)	0.45 (0.2–1)	0.051
Total		121	120			

All OR and *p* values concerning genotypes refer to a comparison with the most common genotype. Adjusted ORs have been corrected for age, gender, presence of hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia, positive family history and smoking habits
ACS Acute coronary syndrome

CAD and the studied variations before or after adjustment for established risk factors of cardiovascular disease. No other genotype grouping gave statistically significant results.

All conventional CVD risk factors—except hypertension—were significantly more common in the CAD group than in the nsCAD group. Multivariate logistic regression analysis substantiated the notion that factors, such as diabetes mellitus, dyslipidemia, smoking, or positive family history, are independently correlated with CAD. No association was established between the studied genotypes and the conventional risk factors of CAD.

Discussion

We performed a case-control study to provide evidence suggesting an association between two common polymorphisms of the IL-8 gene and CAD. We assessed the phenotype–genotype association regarding both suscepti-

bility to angiographically established CAD and the clinical presentation of CAD. We concluded that the common 251AA genotype, and especially the AA₂₅₁TT₇₈₁ combined genotype, are associated with a reduced risk of ACS among CAD patients, independent of the established risk factors of cardiovascular disease. The protective effect of the AA₂₅₁TT₇₈₁ genotype was found to be limited to ACSs. No association was established between AA₂₅₁TT₇₈₁ and susceptibility to angiographically defined coronary artery disease. The fact that stable CAD and ACS have different pathophysiological backgrounds probably explains this observation. ACS is the result of the erosion or rupture of vulnerable plaques that might not significantly compromise the coronary lumen before the event [30–32]. Plaques susceptible to erosion and rupture have a large lipid core enriched with inflammatory cells and a thin fibrous cap with poor SMC content. Vulnerable plaques are highly inflamed, and inflammatory mediators are strongly involved in plaque disruption [30–32]. It is therefore conceivable that the genetic variations that influence the expression of inflammatory mediators could also influence susceptibility to ACS. It has been reported that both the –251A/T and 781C/T polymorphisms and especially the A²⁵¹T⁷⁸¹ haplotype are associated with increased *in vivo* transcriptional activity of the IL-8 gene [16, 17]. The –251A/T polymorphism has been associated, in case control studies, with several neoplasms and a variety of inflammatory diseases, such as RSV-induced bronchiolitis, asthma, acute respiratory distress syndrome, and Behcet disease [18–25]. In the present study, the AA₂₅₁TT₇₈₁

Table V Haplotype Frequencies in Cases and Controls

Haplotype	CAD	nsCAD	ACS	non ACS
A ²⁵¹ T ⁷⁸¹	0.36	0.33	0.33	0.39
A ²⁵¹ C ⁷⁸¹	0.07	0.09	0.05	0.09
T ²⁵¹ T ⁷⁸¹	0.01	0.02	0.02	0.005
T ²⁵¹ C ⁷⁸¹	0.55	0.56	0.59	0.51

CAD Coronary artery disease, *nsCAD* nonsignificant coronary artery disease, *ACS* acute coronary syndrome

haplotype has been associated with a reduced risk of ACS among CAD patients. This is a rather unexpected result, as the latter haplotype has been associated with increased transcriptional activity of the IL-8 gene, and several clinical trials have related increased serum levels of IL-8 with an adverse outcome in CAD and poor prognosis after myocardial infarction [13–15]. However, there is much disagreement in the literature regarding the clinical impact of –251A/T and 781C/T on inflammatory diseases. Furthermore, the impact of both variations on the transcriptional activity of the IL-8 gene has been mostly studied in respiratory epithelial cells in a pulmonary disease setting [16]. The biochemical imbalance that could result from these functional polymorphisms has not yet been assessed in atherosclerosis. For instance, IL-8 has been found to act as a strong chemoattractant for vascular SMCs [11, 12]. SMC-enriched fibrous caps are less prone to rupture [30–32]. It is therefore conceivable that the 251A allele enhances the IL-8 gene's transcriptional activity and might protect CAD patients from acute coronary events by contributing to fibrous cap stability. This is not the first study reporting a possible positive effect of IL-8 on coronary artery disease. Schömig et al. recently reported that, in acute myocardial infarction, IL-8 is associated with increased levels of circulating progenitor cells that contribute to new vessel generation and, therefore, to the subsequent improvement of myocardial function [33]. Nevertheless, our incongruous observation could simply be the result of genotyping errors or a mix-up of genotypes in this study. However, our haplotype frequencies are in accordance with those reported in previous studies. The 251A allele frequency (f) found in our control population was comparable to that found in previous studies of Greek residents and North and South European populations [28, 29, 34–36]. In agreement with our results, 781C was the predominant allele in other European populations. However, it was present in slightly lower allele frequencies than those observed in our control sample [28, 29, 35, 36]. Moreover, results regarding the –251A/T polymorphism have been confirmed by direct sequencing of the PCR products. Furthermore, to eliminate possible bias, we carefully selected both our CAD and control groups. The presence of CAD was confirmed or excluded by coronary angiography. As age is an important risk factor in CAD, the control sample was age matched to the patient group. We also excluded subjects lacking at least one other conventional predisposing factor of cardiovascular disease from our control group. Finally, we minimized ethnic bias within the population by restricting our sample to Caucasian Greek subjects. All traditional cardiovascular risk factors were independently associated with CAD, with the exception of hypertension. The fact that our control sample had been selected to have at least one cardiovascular disease-

predisposing factor—in most cases hypertension—might explain this observation.

Finally, it is necessary to point out that the above observations did not retain their statistical significance after the α level for multiple testing was adjusted. However, genotypes cannot be considered independent variables, especially regarding gene loci with strong linkage disequilibrium. We believe that applying Bonferroni correction in such a comparison only increases the chances of making a type II error.

In conclusion, we demonstrated that the common AA₂₅₁TT₇₈₁ genotype of the IL-8 gene is associated with a reduced risk of ACS in CAD subjects. Our statistical approach revealed that this effect works independently of established cardiovascular risk factors and indicates that IL-8 is implicated in the biochemical pathways that lead to ACSs. However, the functional impact of the AA₂₅₁TT₇₈₁ genotype in the setting of CAD and plaque disruption should be further investigated.

References

- 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;330:1041–6.
- Nora JJ, Lortscher RH, Spangler RD, Nora AH, Kimberling WJ. Genetic-epidemiologic study of early-onset ischemic heart disease. *Circulation* 1980;61:503–8.
- Boisvert WA, Curtiss LK, Terkeltaub RA. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in atherosclerosis. *Immunol Res* 2000;21:129–37.
- Fujishima S, Sasaki J, Shinozawa Y, Takuma K, Hori S, Aikawa N. Interleukin 8 in ARDS. *Lancet* 1993;342:237–8.
- Gross V, Andreesen R, Leser HG, Ceska M, Liehl E, Lausen M, et al. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 1992;22:200–3.
- Bäckhed F, Torstenson E, Seguin D, Richter-Dahlfors A, Rokbi B. *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-8 receptor expression in the human gastric epithelium. *Infect Immun* 2003;71:3357–60.
- Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001;119:1329–36.
- Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:769–74.
- De Benedetti F, Pignatti P, Bernasconi S, Gerloni V, Matsushima K, Caporali R, et al. Interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with juvenile rheumatoid arthritis. Relation to onset types, disease activity, and synovial fluid leukocytes. *J Rheumatol* 1999;26:425–31.
- Wang N, Tabas I, Winchester R, Ravalli S, Rabbani LE, Tall A. Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J Biol Chem* 1996;271:8837–42.
- Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL, et al. Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;75:1–7.

12. Yue TL, Mckenna PJ, Gu JL, Feuerstein GZ. Interleukin-8 is chemotactic for vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1993;240:81–4.
13. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M, Ferrer J. Prognostic value of interleukin-8 as a predictor of heart failure in patients with myocardial infarction and percutaneous intervention. *Int J Cardiol* 2006;111:158–60.
14. Inoue T, Komoda H, Nonaka M, Kameda M, Uchida T, Node K. Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2008;124:319.
15. Kanda T, Hirao Y, Oshima S, Yuasa K, Taniguchi K, Nagai R, et al. Interleukin-8 as a sensitive marker of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996;77:304–7.
16. Hacking D, Knight JC, Rockett K, Brown H, Frampton J, Kwiatkowski DP, et al. Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associated with respiratory syncytial virus disease-susceptibility. *Genes Immun* 2004;5:274–82.
17. Ohyauchi M, Imatani A, Yonechi M, Asano N, Miura A, Iijima K, et al. The polymorphism interleukin 8 -251 A/T influences the susceptibility of *Helicobacter pylori* related gastric diseases in the Japanese population. *Gut* 2005;54:330–5.
18. Kamali-Sarvestani E, Aliparasti MR, Atefi S. Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma* 2007;54:484–9.
19. Ben Nasr H, Chahed K, Mestiri S, Bouaouina N, Snoussi K, Chouchane L. Association of IL-8 (-251)T/A polymorphism with susceptibility to and aggressiveness of nasopharyngeal carcinoma. *Hum Immunol* 2007;68:761–9.
20. Wei YS, Lan Y, Tang RG, Xu QQ, Huang Y, Nong HB, et al. Single nucleotide polymorphism and haplotype association of the interleukin-8 gene with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Immunol* 2007;125:309–17.
21. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Deamaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:3369–72.
22. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000;55:1023–7.
23. Lee EB, Kim JY, Zhao J, Park MH, Song YW. Haplotype association of IL-8 gene with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 2007;69:128–32.
24. Hofner P, Balog A, Gyulai Z, Farkas G, Rakonczay Z, Takács T, et al. Polymorphism in the IL-8 gene, but not in the TLR4 gene, increases the severity of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2006;6:542–8.
25. Kamali-Sarvestani E, Nikseresht AR, Aliparasti MR, Vessal M. IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients. *Neurosci Lett* 2006;404:159–62.
26. 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.
27. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
28. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:671–6.
29. Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, et al. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet* 2001;69:413–9.
30. Grønholdt ML, Dalager-Pedersen S, Falk E. Coronary atherosclerosis: determinants of plaque rupture. *Eur Heart J* 1998;19(Suppl C):C24–9.
31. Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, et al. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart* 2004;90:1385–91.
32. Henriques de Gouveia R, van der Wal AC, van der Loos CM, Becker AE. Sudden unexpected death in young adults. Discrepancies between initiation of acute plaque complications and the onset of acute coronary death. *Eur Heart J* 2002;23:1433–40.
33. Schömig K, Busch G, Steppich B, Sepp D, Kaufmann J, Stein A, et al. Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:1032–7.
34. Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Felekouras E, Nikiteas N, Karakitsos P, Panoussopoulos D, et al. Relation between common polymorphisms in genes related to inflammatory response and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:5037–43.
35. Sánchez E, Sabio JM, Callejas JL, de Ramón E, Garcia-Portales R, García-Hernández FJ, et al. Association study of genetic variants of pro-inflammatory chemokine and cytokine genes in systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet* 2006;7:48.
36. Puthothu B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A. Impact of IL8 and IL8-Receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clin Mol Allergy* 2006;4:2.

Interleukin 8 and cardiovascular disease

Stavros Apostolakis, Konstantina Vogiatzi, Virginia Amanatidou, and Demetrios A. Spandidos*

Laboratory of Clinical Virology, Faculty of Medicine, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece

Received 9 May 2009; revised 1 July 2009; accepted 8 July 2009; online publish-ahead-of-print 18 July 2009

Time for primary review: 27 days

KEYWORDS

Chemokines;
Interleukin 8;
Cardiovascular disease;
Biochemical markers

Since the establishment of the inflammatory basis of atherosclerosis, several pro- or anti-inflammatory agents have been examined as potential mediators of the biochemical pathways of lesion formation. Interleukin (IL)-8 was first characterized in 1987. Since then, knowledge regarding its role in leucocyte trafficking and activation has advanced rapidly, especially in the field of cardiovascular disease. In the scientific literature, there is sufficient evidence to support beyond any doubt the involvement of IL-8 in the establishment and preservation of the inflammatory micro-environment of the insulted vascular wall. However, how the information derived from *in vitro* studies and animal models can be applied in clinical practice has yet to be determined. In the present review, the available evidence regarding the role of IL-8 in cardiovascular disease is presented, and future perspectives are discussed.

1. Introduction

1.1 Chemokines

The concept of proteins dedicated to cell recruitment and activation in sites of inflammation has been recognized since the days of Metchnikoff. However, it was not until 1970 that the term 'cytokine' was introduced to refer to a large family of peptides involved in a broad range of cell signalling and activation.¹

Chemokines are low molecular weight chemotactic cytokines. They consist of an expanding family of ~50 ligands and 20 receptors.² Chemokines are defined and classified by their functional and structural characteristics. As their name implies, their function is to induce the direct migration of cells to the site of inflammation. In terms of their structure, chemokines are small, with a molecular mass of 8–10 kDa.^{2,3} They share ~20–50% gene and amino acid sequence homology, and possess conserved amino acids that are responsible for the creation of their three-dimensional or tertiary structure. Typically, the first two cysteines in a chemokine are situated close together near the N-terminal of the mature protein, with a third cysteine residing in the centre of the molecule and a fourth near the C-terminal.^{2,4} Based on the number and structural arrangement of their amino-terminal polypeptide sequence, chemokines are divided into four subfamilies.⁴ CXC chemokines have a single amino acid separating the two amino-terminal cysteine residues of the protein. CC chemokines do not have the intervening amino acid between the cysteines.⁴ The CX3C subfamily has a single member, fractalkine (FKN),

which possesses three amino acids separating the two amino-terminal cysteine residues.⁵ The C subfamily comprises the recently discovered lymphotactin (XCL1) and single C motif chemokine 1 (SCM1 or XCL2). These are the only C family members identified to date and are characterized by a lack of two of the four conserved cysteines in the mature protein.^{6,7} Most chemokines are produced as pro-peptides, beginning with a signal peptide of ~90 amino acids that gets cleaved to the bioactive molecule during the process of its secretion from the cell.⁸ Chemokines exert their biological activity by binding to specific cell surface receptors. An unusual characteristic of most chemokine receptors is their high affinity for multiple ligands.⁸

1.2 The chemokine network in atherosclerosis

Atherosclerosis is considered to be a disease involving inflammatory cascades initiated by a diverse group of stimuli. The implication of chronic inflammation in the pathogenesis of atherosclerotic lesions was initially proposed by Virchow⁹ in the mid-nineteenth century and evolved over the next century into the response-to-injury hypothesis described by Ross and Glomset.¹⁰ One of the earliest events in the latter model of atherogenesis is leucocyte adhesion to the dysfunctional endothelium. A variety of cells have been identified in the time course of lesion development. Monocyte-derived macrophages comprise the majority of cellular components of the inflamed vascular tissue. However, the presence of lymphocytes and, to a lesser extent, mast, dendritic, and endothelial progenitor cells has been directly demonstrated in various experimental settings.¹¹ Although a variety of stimuli can trigger the inflammatory cascade, lipid accumulation is by far the most favourably substantiated factor in experimental

* Corresponding author. Tel: +30 2810394633; fax: +30 210 725 2922.
E-mail address: spandidos@spandidos.gr

atherosclerosis. Extracellular accumulation of lipids occurs early in response to increased plasma lipoprotein levels.¹² Low-density lipoprotein (LDL) is modified rapidly in the sub-endothelial space into minimally modified LDL, and subsequently into oxidized LDL (oxLDL).¹² Although direct chemotactic properties have been attributed to oxLDL,^{13,14} the accumulation of oxLDL in the intima of the vessel promotes infiltration of the inflammatory cells mostly by inducing chemokine activity.^{12,15} Each stage of atherogenesis is regulated by specific chemokine ligand/receptor interaction appropriately described by Zernecke *et al.*¹⁶ as 'a framework of highly elaborated and specialized division of labour'.

In the initial stages of atherogenesis, oxLDL induces the expression of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, FKN, and growth-related oncogene (GRO)- α by smooth muscle cells (SMCs) and endothelial cells (ECs).^{17,18} Activated platelets can be an alternative chemokine source depositing regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) and platelet factor 4 on ECs lining early atherosclerotic lesions.^{17,18} The interaction of FKN, RANTES, and GRO- α with the receptors CX3CR1, CCR1, and CXCR2, respectively, is currently considered to be an early pathway leading to the firm adhesion of rolling monocytes to stimulated endothelium.¹⁷⁻¹⁹ GRO- α immobilized on the surface of ECs via heparin proteoglycans induce the firm adhesion of rolling monocytes expressing CXCR2¹⁷, whereas FKN as a structurally unique chemokine fused to a trans-membrane mucin stalk acts as an efficient adhesion molecule through an integrin-independent mechanism.²⁰

MCP-1 takes the process one step further. Soluble MCP-1, secreted by ECs and SMCs, induces structural changes in the cytoskeleton of CCR2-expressing adherent monocytes, potentiating transendothelial migration.¹⁷⁻¹⁹ Concurrently, CXC chemokines induced by interferon (IFN)- γ , as well as IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN- γ , and IFN-inducible T cell α chemoattractant expressed on stimulated ECs interact with CXCR3-expressing T cells, inducing their rapid and shear-resistant arrest and increasing the vascular inflammatory response.^{17-19,21} The peripheral blood homeostasis and homing of neutrophils and vascular progenitor cells with relevance to atherosclerosis is controlled by CXCR2 and CXCR4 and their ligands interleukin (IL)-8 and GRO- α .¹⁶ IL-8 is highly expressed by lesion macrophages, as well as by ECs and SMCs. IL-8, although mainly a granulocyte chemoattractant, also induces the firm adhesion of CXCR2-expressing monocytes to endothelium under physiological flow conditions.²¹ As in the case of RANTES, GRO- α , and FKN, IL-8 is involved in the firm adhesion of rolling monocytes in the early stages of atherogenesis.^{16,17} However, a role is implied in the more advanced stages of atherosclerosis, probably by potentiating plaque angiogenesis.²² Therefore, in the course of atherosclerosis, chemokines form a complicated network by promoting specific cellular interactions.

Different chemokines promote different pathways. However, the interaction of the same chemokine ligand with different receptors also results in a different outcome. Through the use of selective receptor antagonists, Weber *et al.* demonstrated that CCR1, but not CCR5, mediated RANTES-induced arrest of monocytes, and activated T and Th1 cells. CCR5 promoted spreading of the cells along the endothelium, whereas both CCR1 and CCR5

contributed to transendothelial chemotaxis of the cells triggered by RANTES.²³ Moreover, specific chemokine/ligand interactions lead not only to specific mononuclear subpopulations recruitment but also to the chemotaxis and activation of distinct monocyte subsets.¹⁶ Thus, it is obvious that chemokine pathways most actively implicated in atherosclerosis, such as FKN/CX3CR1, MCP-1/CCR2, GRO- α /CXCR2, and IL-8/CXCR2, are recruited in specific stages of lesion formation in a highly specialized and collaborative manner.

In the present review, an effort is made to provide data related to the role of IL-8 in atherogenesis. Data derived from *in vitro* studies and animal models regarding the role of IL-8 in atherogenesis are limited, perhaps due to the initial role that has been attributed to IL-8, i.e. as a mainly neutrophil chemoattractant. However, IL-8 has been intensively studied as a potential marker of atherosclerosis. Serum IL-8 levels have been tested for their ability to identify the presence of subclinical atherosclerosis, as well as to predict the occurrence and outcome of acute coronary events.

1.3 IL-8: structural and functional characteristics

IL-8, or CXCL8 based on the latest nomenclature, represents the prototypical chemokine of the CXC subfamily.²⁴ IL-8 is actively secreted in the extracellular space as a result of a variety of cellular stimuli. It is a small protein; its mature, fully active form has only 72 amino acids. Transcription of the IL-8 gene encodes for a protein of 99 amino acids that is proteolytically cleaved to a biologically active peptide of either 77 amino acids in non-immune cells or 72 amino acids in monocytes and macrophages.²⁵

A wide variety of cell types, including virtually all nucleated cells, are potential sources of IL-8.²⁴⁻²⁶ However, the principal cellular sources of IL-8 are typically monocytes and macrophages. IL-8 bears the primary responsibility for the recruitment of monocytes and neutrophils, the signature cells of acute inflammatory response. Cellular recruitment occurs through the development of a chemotactic gradient, which causes the inflammatory cell to move towards an area of increased chemokine concentration.²⁷ *In vivo*, the chemotactic gradient may be generated by the binding of IL-8 to basement membrane proteins. This gradient aids in bringing cells towards the site of inflammation and also retains them once they have arrived.²⁷ In addition to recruitment, IL-8 serves to promote the activation of monocytes and neutrophils.²⁴⁻²⁷

The biological effects of IL-8 are mediated through the binding of IL-8 to two cell surface receptors, CXCR1 and CXCR2.^{28,29} These G-protein-coupled receptors share considerable structural similarity and induce a nearly identical range of biological activities.^{28,29} Signals are transmitted across the membrane through ligand-induced structural changes, exposing epitopes on the intracellular loops and carboxy-terminal tail of the receptor. These epitopes promote coupling to functional heterotrimeric G proteins.^{30,31} The biological activity of IL-8 and other CXC chemokines is in part dependent on the ELR amino acid motif. The presence of these three specific amino acids is crucial for the binding of IL-8 to its receptor.³²

IL-8 is resistant to temperature and proteolysis, and is relatively resistant to acidic environments. These

biochemical characteristics make it an ideal candidate molecule for sites of acute inflammation, where it must withstand harsh and hostile conditions.³² Another unique functional characteristic of IL-8 is its relative longevity at sites of acute inflammation.³² It is produced early in the inflammatory response, but remains active for a prolonged period of time, even days and weeks. This is in contrast to most other inflammatory cytokines, which are typically made and cleared *in vivo* in a matter of hours.³² A third interesting aspect IL-8 involves the oxidant regulation of gene expression. IL-8 is highly sensitive to oxidants, and anti-oxidants substantially reduce IL-8 gene expression.³³ The role of oxidants in the regulation of IL-8 and other chemokines has relevance in the field of cardiovascular disease, where ischaemia-induced oxidative stress is both a marker of disease and a potential therapeutic target.

2. IL-8 and cardiovascular disease: the facts

2.1 Data derived from *in vitro* studies and animal models

IL-8 was first characterized in 1987. Since then, knowledge regarding its function in leucocyte trafficking and activation has advanced rapidly, especially regarding its role in atherosclerosis. Several studies have identified IL-8 in sites of vascular injury, whereas others have demonstrated that IL-8 potentially plays a role in various stages of atherosclerosis.

Rus *et al.* first reported high levels of IL-8 in the human arterial atherosclerotic wall, as cellular and extracellular deposit in the connective tissue matrix. Quantitative determination of IL-8 by enzyme-linked immunosorbent assay revealed that IL-8 levels were significantly increased in fibrous plaques compared with normal intima.³⁴ Apostolopoulos *et al.* took this one step further, identifying macrophages as the main source of IL-8 in atherosclerotic plaques. The authors demonstrated an enhanced capacity of macrophages to produce IL-8 compared with normal and patient blood monocytes, and concluded that macrophages are a major site of IL-8 mRNA production in atherosclerotic plaques.³⁵ Similarly, a year later, Liu *et al.* detected high levels of IL-8 in foam cells from human atherosclerotic tissue, compared with monocytes or monocyte-derived macrophages in culture. The authors further demonstrated that oxysterols stimulate IL-8 production by monocytes and monocyte-derived macrophages *in vitro* in time- and dose-dependent manners.³⁶

However, not only macrophages, but practically every cellular component of the vascular wall has been reported to be a potential source of IL-8. Dje N'Guessan *et al.*³⁷ showed that oxLDL induced IL-8 and MCP-1 secretion in cultured ECs, and further demonstrated that oxLDL-induced IL-8 and MCP-1 were reduced in cells treated with statins. Geisel *et al.*³⁸ reported that IL-8 expression by cultured ECs was enhanced in a dose-dependent manner by homocysteine—a well-recognized independent risk factor for atherosclerosis. Ryoo *et al.* reported that vascular SMCs are another potential source of IL-8, demonstrating that LDL-stimulated vascular SMCs induced IL-8 production in dose- and time-dependent manners at the transcription level. The authors further revealed that LDL intracellular signalling is conveyed via the generation of hydrogen peroxide (H₂O₂), the phosphorylation of p38 MAPK, the

activation of AP-1, and the participation of NF- κ B.³⁹ Similarly, Ito *et al.* reported that Ang II increased IL-8 production, whereas fluvastatin decreased basal and Ang II-induced IL-8 production in human SMCs. These findings indicated that Ang II may exacerbate atherosclerosis through the induction of IL-8 in vascular SMCs. The authors concluded that statins may exert therapeutic effects by modulating IL-8 synthesis in patients with atherosclerotic disease.⁴⁰

Once the presence of IL-8 in atherosclerotic plaques was sufficiently substantiated, with macrophages, SMCs, and ECs identified as its main sources, many investigators sought to identify the pathways leading to IL-8 release in sites of atherogenesis. Notably, Gerszten *et al.* demonstrated that IL-8 can rapidly cause rolling monocytes to firmly adhere to monolayers expressing E-selectin, whereas related chemokines do not. These effects were not correlated with the induction of a calcium transient or with chemotaxis. The authors concluded that IL-8 is an important modulator of monocyte–endothelial interaction under flow conditions—a rather unexpected role for a chemokine that was previously considered a mere neutrophil chemoattractant.⁴¹ Yue *et al.*⁴² demonstrated that IL-8 is also a mitogenic and chemotactic for vascular SMCs, as it induced the concentration-dependent stimulation of DNA synthesis and cell proliferation in both human and rat aortic SMCs. Additionally, Moreau *et al.*, by applying immunohistochemistry in human atherosclerotic plaques, revealed the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 in some but not all macrophage- and IL-8-rich areas. The authors further demonstrated that IL-8 inhibited TIMP-1 accumulation *in vitro* and concluded that IL-8 may play an atherogenic role by inhibiting local TIMP-1 expression, thereby leading to an imbalance between matrix metalloproteinases and TIMPs at focal sites in the atherosclerotic plaque.⁴³ Rydberg *et al.*⁴⁴ demonstrated that hypoxia enhanced 25-hydroxycholesterol (25-OH-cholesterol)-induced IL-8 secretion in human monocyte-derived macrophages, and provided evidence indicating that both 25-OH-cholesterol and hypoxia mediate increased IL-8 secretion by increasing the level of the intracellular signalling molecule, H₂O₂. Yang *et al.* demonstrated that tumour necrosis factor (TNF)- α stimulated IL-8 expression at the RNA and protein level in human umbilical vein ECs. The authors further demonstrated that aspirin significantly inhibited the release of TNF-stimulated MCP-1 and IL-8, proposing an additional therapeutic effect of aspirin in atherosclerosis.⁴⁵ Kim *et al.* evaluated the expression of IL-8 in cultured vascular SMCs obtained from the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats (SHRs) and normotensive Wistar-Kyoto rats (WKY), and demonstrated that IL-8 expression in thoracic aorta tissue and vascular SMCs was significantly higher in SHRs than in WKY mice. This suggests that IL-8 plays an important role in the pathogenesis of hypertension.⁴⁶ In an entirely novel experimental setting, Henrichot *et al.* showed that perivascular white adipose tissue (pWAT)—which is markedly increased by a high-fat diet—is in close proximity to the vascular walls and serves as a potential source of IL-8, particularly at sites that tend to develop atherosclerosis. The authors concluded that human pWAT has chemotactic properties due to its secretion of different chemokines, and proposed that it might contribute to the progression of obesity-associated atherosclerosis.⁴⁷

Simonini *et al.* assessed whether IL-8 plays a role in mediating angiogenic activity in atherosclerosis. The authors demonstrated in a rat cornea micropocket assay that neutralizing IL-8 attenuated *in vivo* corneal neovascular response, and concluded that in human coronary atherosclerosis, IL-8 is an important mediator of angiogenesis that may contribute to plaque formation via its angiogenic properties.²²

Additional supporting evidence that IL-8 plays a role in atherogenesis was provided by a brilliant animal model constructed by Boisvert *et al.* The authors used LDL receptor knockout mice that were irradiated and repopulated with bone marrow cells lacking the murine homologue of IL-8 receptor, CXCR2. They concluded that double knockout mice had less extensive lesions and fewer macrophages than those receiving bone marrow cells expressing the receptor.⁴⁸ However, since CXCR2 has multiple ligands (CXCL1 and CXCL8), the latter study is not definitive in substantiating a role for IL-8 in atherosclerosis. In fact, Weber *et al.*⁴⁹ provided evidence that macrophage migration inhibitory factor (MIF) might also be an alternative CXCR2 ligand. The authors further demonstrated that MIF possesses a pseudo-(E)LR motif that enables MIF to act as a non-canonical CXCR2 ligand, and concluded that this structural resemblance may be the background of pro-inflammatory MIF/CXCR2 interactions. Consequently, deletion of CXCL1 in LDLr^{-/-} mice¹⁶ reduces atherosclerosis to a lesser extent than bone marrow CXCR2 deficiency in LDLr^{-/-} mice, with effects on macrophage accumulation in established rather than early lesions. Thus, MIF, as a CXCR2 alternative ligand, may partially compensate for a lack of CXCL1.¹⁶ Nevertheless, Boyle *et al.*⁵⁰ evaluated the effect of direct IL-8 inhibition on the degree of myocardial injury encountered during reperfusion in New Zealand White rabbits, demonstrating that the neutralization of IL-8 significantly reduced the degree of necrosis in a rabbit model of myocardial ischaemia-reperfusion injury.

2.2 Data derived from case-control studies

The scientific literature is overflowing with evidence regarding the potential role of IL-8 in atherosclerosis, either as a marker or as a potential therapeutic target.

A popular field of investigation is the determination of whether IL-8 is a predictor of short- or long-term outcome in patients with coronary artery disease (CAD). Most recently, Inoue *et al.* evaluated the serum levels of 10 cytokines as potential markers of long-term outcome in angiographically identified stable CAD. The authors concluded that IL-8 was the only cytokine to predict cardiovascular events, doing so independently of the other nine cytokines and high sensitivity C-reactive protein.⁵¹ Elmas *et al.*⁵² demonstrated higher TIMP-1 and IL-8 serum levels in patients with ventricular fibrillation (VF) complicating myocardial infarction, suggesting that patients prone to VF during myocardial infarction are in an increased pro-inflammatory state compared with those without VF. Panichi *et al.* evaluated the impact of serum IL-8 on the outcome of end-stage renal disease (ESRD) patients. The authors demonstrated that IL-8 is a powerful independent predictive factor for cardiovascular and overall mortality in ESRD patients.⁵³ Finally, in the largest case-control study assessing the predictive value of IL-8 in patients with CAD, Herder *et al.* demonstrated that baseline

concentrations of IL-8 were significantly higher in CAD than in non-CAD patients. However, adjustment for further cardiovascular and immunological risk factors attenuated the observed association, and the authors concluded that systemic levels of IL-8 precede CAD, but do not represent an independent risk factor.⁵⁴

In the field of interventional cardiology, Dominguez-Rodriguez *et al.* evaluated IL-8 levels after percutaneous coronary intervention (PCI) in patients with acute myocardial infarction (AMI). The authors concluded that increased serum levels of IL-8 after PCI are probably a predictor of the development of heart failure in patients with AMI.⁵⁵ Vogiatzi *et al.* investigated the potential influence of two common polymorphisms of the IL-8 gene, -251A/T, and 781C/T, on susceptibility to CAD. The authors reported that the frequency of the 251AA genotype was lower in CAD patients with a history of acute coronary syndromes than in asymptomatic subjects or patients with stable CAD, and suggested that the genetic diversity of the IL-8 gene influences the clinical manifestation of CAD.⁵⁶ The same authors later assessed the impact of the -251A/T and 781C/T polymorphisms on the outcome of PCI, reporting an association between the T251T781 haplotype and in-stent restenosis (ISR) and suggesting that IL-8-mediated pathways are implicated in the process of ISR.⁵⁷

IL-8 has also been thoroughly investigated in terms of its impact on the outcome of cardiopulmonary bypass (CPB) and cardiac transplantation (CT) surgeries. Kawamura *et al.*⁵⁸ assessed serum IL-8 levels in patients subjected to coronary artery bypass grafting (CABG), ascertaining that the levels increased significantly and remained elevated for 180 min after the declamping of the aorta. Hummel *et al.* evaluated IL-8 levels in patients with cardiogenic shock or end-stage heart disease treated with assist device implantation as a bridge to heart transplantation. Reduced levels of IL-8 were correlated with uncomplicated course of disease, and the authors concluded that monitoring IL-8 values during ventricular assist device support allows for the early identification of high-risk patients and may aid in the optimization of antimicrobial therapy and the selection of the appropriate time for transplantation.⁵⁹ Kawamura *et al.* reported increased serum levels of IL-8 in patients 1 h after CABG surgery. Patients pre-treated with methylprednisolone had lower serum concentrations of IL-8 compared with non-treated patients.⁶⁰ Oz *et al.* reported increased serum levels of IL-8 in patients subjected to CT compared with those who underwent elective cardiac surgery (non-CT). This observation was attributed to the longer ischaemic times of CT patients compared with those of non-CT patients, and the authors suggested that IL-8 may contribute to myocyte injury after prolonged hypothermic cardiac ischaemia, as occurs during human CT.⁶¹ Burns *et al.* evaluated the expression levels of IL-8 in myocardial and skeletal muscle tissue in patients subjected to CPB with or without hypothermic arrest. The authors concluded that during CPB, the production of IL-8 mRNA in myocardial and skeletal muscle occurs in most patients. This may result in increased local IL-8 concentrations, contributing to tissue injury after CPB.⁶² Nandate *et al.* measured IL-8 levels in paired arterial and jugular bulb samples obtained before, during, and after CPB, and observed an increase in juguloarterial IL-8 gradients 1 h post-CPB up to 6 h post-CPB. The authors concluded that these data imply

specific and significant IL-8 production in the cerebrovascular bed during CPB.⁶³ Wu *et al.*⁶⁴ assessed the impact of IL-8 serum levels post-CABG on the incidence of post-operative atrial fibrillation (AF) in CABG patients and reported higher concentrations of serum IL-8 in CABG patients with post-operative AF, suggesting that inflammation is implicated in the pathogenesis of post-operative AF following open heart surgery.

Many investigators have assessed IL-8 as a potential marker of unstable CAD, with remarkably equivalent results. Kanda *et al.*⁶⁵ evaluated serum levels of IL-8 related to the clinical presentation of CAD and concluded that elevated serum IL-8 is a useful marker for the detection of unstable angina, as well as an earlier marker of AMI than changes in serum myoglobin, leucocytes, creatine kinase, or creatine kinase-MB. Similarly, Zhou *et al.*⁶⁶ demonstrated that serum levels of IL-8 were significantly higher in patients with unstable angina or AMI than in healthy control subjects, suggesting that IL-8 is involved in the process of ischaemic heart disease. Subsequently, Romuk *et al.* evaluated serum IL-8 in patients with stable and unstable CAD. Higher levels of IL-8 were observed in patients with unstable CAD, leading the authors to conclude that IL-8 may be a useful clinical predictor of unstable CAD.⁶⁷ The same hypothesis was tested more recently by Hashmi and Zeng. The authors assessed serum IL-8 levels in patients with different clinical presentations of CAD. In accordance with previous results, the increased activity of IL-8 was observed in patients with unstable angina and AMI compared with those with stable CAD.⁶⁸ Abe *et al.*⁶⁹ reported that serum IL-8 concentrations showed a transient rise during the very early phases of AMI, indicating the importance of IL-8-mediated pathways in the development of myocardial injury in AMI. Schömig *et al.* investigated the relationship of circulating progenitor cells and IL-8 in AMI, demonstrating an association of IL-8 and circulating CD133+ CD45-progenitor cells in AMI and concluding that in AMI, IL-8 is associated with circulating progenitor cells. The above pathway, in addition to the pro-angiogenic functions of IL-8, may contribute to new vessel generation and may thereby improve myocardial function.⁷⁰ Riesenber *et al.* reported increased levels of IL-8 in the sera of patients with AMI, with significantly higher levels in those with complicated myocardial infarction. The highest levels of IL-8 were detected at the time of admission to the coronary care unit, and thereafter decreased significantly. This indicated that IL-8 contributes to neutrophil-mediated tissue injury.⁷¹ Finally, de Winter *et al.*⁷² reported that IL-8 released in plasma after AMI subsequently binds to red blood cells, resulting in only a transient rise of plasma IL-8 and a more prolonged increase in erythrocyte-bound IL-8. In accordance with the latter observation, Tziakas *et al.* later reported that erythrocyte membrane-bound IL-8 is elevated in patients with acute coronary syndromes compared with those with chronic stable angina. The authors suggested that these findings underscore the role of erythrocytes in the development of unstable atherosclerotic plaque.⁷³

IL-8 has also been assessed as a marker of outcome in patients resuscitated following cardiopulmonary arrest. Most recently, Oda *et al.*⁷⁴ evaluated cerebrospinal fluid and serum IL-8 and IL-6 levels in such patients, demonstrating a significant correlation between Glasgow Outcome

Scale score evaluated 6 months after resuscitation with levels of cerebrospinal fluid, IL-8, and IL-6. These results are in agreement with the findings of Mussack *et al.*, who compared S-100B and IL-8 serum levels at the time of admission and levels 12 h after admission with neurological long-term outcome 12 months after cardiac arrest following the return of spontaneous circulation, as well as after severe traumatic brain injury. The authors concluded that significantly elevated S-100B and IL-8 serum levels 12 h after cardiac arrest suggest that primary brain damage and systemic inflammatory response are comparably serious with the damage involved in traumatic brain injury.⁷⁵

Finally, IL-8 has been evaluated as a marker of atherosclerosis in patients at high risk without direct evidence of CAD. In this area, Kim *et al.* demonstrated that circulating levels of MCP-1 and IL-8 are associated with obesity-related parameters such as body mass index, waist circumference, C-reactive protein, IL-6, HOMA, and high-density lipoprotein. These findings suggest that circulating MCP-1 and/or IL-8 may be a potential marker, linking obesity with obesity-related metabolic complications such as atherosclerosis and diabetes.⁷⁶ Similarly, in primary prevention, Trøseid *et al.* reported that physical exercise significantly reduced MCP-1 and IL-8 levels, demonstrating a reduction in serum IL-8 in patients with metabolic syndrome subjected to a physical exercise programme compared with baseline levels and with the levels of a non-exercise control group. The authors concluded that the protective effect of physical exercise might be due in part to the suppression of the inflammatory process.⁷⁷ Besides physical exercise, statins seem capable of affecting atherosclerosis-related increases in IL-8 production. In this respect, Rezaie-Majd *et al.* demonstrated that simvastatin exerts anti-inflammatory properties by down-regulating IL-8 production by the endothelium and leucocytes. These effects, which were substantiated *in vivo* and *in vitro*, may explain some of the clinical benefits of these drugs in the treatment of atherosclerosis.⁷⁸

3. IL-8 and cardiovascular disease: perspectives or utopia

Inflammation is a hallmark of atherosclerosis and takes place as a consequence of endogenous or exogenous insult of the vessel wall. The progression of this inflammatory response is primarily regulated by specific patterns of cytokine expression. The balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is of great importance in vascular inflammation and is underscored by the fact that the *in vivo* down-regulation of pro-inflammatory cytokines reduces atherogenesis.

Since the establishment of the inflammatory basis of atherosclerosis, several pro- or anti-inflammatory agents have been examined as potential mediators of the biochemical pathways of lesion formation. Almost every one of the 33 currently known ILs has been implicated, in a more or less disease-specific way, in aspects of cardiovascular disease, in particular atherosclerosis.

3.1 IL-8 as a marker of cardiovascular disease

There is sufficient evidence in the scientific literature to support beyond any doubt the involvement of IL-8 in the establishment and preservation of the inflammatory micro-environment of the insulted vascular wall. However, how

the information derived from *in vitro* studies and animal models can be applied in a clinical setting remains to be determined. The management of atherosclerotic cardiovascular disease consists of primary prevention, secondary prevention, and treatment of acute complications of atherosclerosis. Primary prevention requires overall cardiovascular risk estimation and risk factor modification. In cardiovascular risk estimation, several reports have indicated that increased serum levels of IL-8 are correlated with an increased risk of cardiovascular disease or acute cardiovascular events. However, these data are primarily the results of single-centre small-scale observational studies. There is limited data available derived from large-scale clinical trials illustrating the additive value of IL-8 on traditional risk factors as prognostic markers of short- or long-term outcome after acute cardiovascular events or in a primary prevention setting. Of note, the largest available cohort, including 381 CAD patients and 1977 controls, revealed that elevated systemic levels of IL-8 do not represent independent risk factors for coronary events. Another issue is whether additional markers for CAD are required in either a primary or a secondary setting. Inflammatory markers have to demonstrate high specificity and sensitivity and increase predictive value positively or negatively, especially if we take into account cost-efficiency parameters and the fact that most traditional risk factors are highly modifiable.

Regarding the therapeutic potential of IL-8, only limited data are available. As in any immune-modulating therapeutic approach, there are several drawbacks that need to be considered. First of all, atherosclerosis is a chronic condition; thus, long-term therapy must be applied. This raises tolerability and safety issues for a potential therapeutic agent that blocks a non-specific chemotactic pathway. Secondly, IL-8 is an important mediator of several aspects of immune response. Therefore, the complete blockade of IL-8 signalling pathways may not be desirable. Thus, techniques need to be applied to ensure that IL-8 signal blocking takes place in specific areas and tissues. An appealing area of investigation for immune-suppressive therapies is restenosis after PCI, in which IL-8 signalling blockers may be tested as potential agents for stent eluting. This latter approach insures better targeting and probably less side effects than systemic treatment. In human coronary atherosclerosis, IL-8 has been shown to be a mediator of angiogenesis and may contribute to plaque formation via its angiogenic properties.²² Blocking angiogenesis has proven to be effective in reducing in-stent plaque progression.⁷⁹ No data are available to indicate that blocking IL-8 activity reduces neovascularization in the area of in-stent plaque formation. However, a specific IL-8 gene haplotype has been associated with reduced risk for ISR, providing indirect evidence that the IL-8-mediated pathways are involved in the process of ISR.⁵⁷ Thus, targeting IL-8 pathways in an effort to reduce the rate of ISR could be a challenging field of investigation.

Nonetheless, it is necessary to take into account that all therapeutic approaches to cardiovascular disease have been evaluated in large-scale clinical trials with specific endpoints. Therefore, despite its promising *in vivo* and *in vitro* indications, any IL-8 modulating therapy must be proven to exhibit the ability to reduce cardiovascular morbidity and mortality. To the best of our knowledge, no large-scale clinical trials are currently evaluating the

effectiveness of IL-8-based treatments in cardiovascular disease. It will be therefore a long wait before IL-8-based therapeutic approaches find their way into clinical practice.

Conflict of interest: none declared.

Funding

The work was supported by the Hellenic Cardiologic Society.

References

- Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999;**20**:254–257.
- Luster AD. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;**338**:436–445.
- Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 2003;**21**:48–49.
- Fernandez E, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;**42**:469–499.
- Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997;**91**:521–530.
- Curnock AP, Logan MK, Ward SG. Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology* 2002;**105**:125–136.
- Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;**288**:L3–L15.
- Apostolakis S, Papadakis GE, Krambovitis E, Spandidos DA. Chemokines in vascular pathology. *Int J Mol Med* 2006;**17**:691–701.
- Virchow R. Phlogose und thrombose in gefasssystem. In: *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt, Germany: Staatsdruckerei, 1856. p458–468.
- Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 1973;**180**:1332–1336.
- Weber C. Chemokines in atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;**28**:1896.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:5134–5138.
- Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:2995–2998.
- McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993;**92**:1004–1008.
- Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;**344**:254–257.
- Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;**28**:1897–1908.
- Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:1997–2008.
- Barlic J, Murphy PM. Chemokine regulation of atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 2007;**82**:226–236.
- Weber KS, von Hundelshausen P, Clark-Lewis I, Weber PC, Weber C. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol* 1999;**29**:700–712.
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;**385**:640–644.
- Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR. Cytokines and cardiovascular disease. *J Leukoc Biol* 2005;**78**:805–818.
- Simonini A, Moscucci M, Muller DW, Bates ER, Pagani FD, Burdick MD et al. IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue. *Circulation* 2000;**101**:1519–1526.

23. Weber C, Weber KSC, Klier C, Gu H, Horuk R, Wank R *et al.* Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in recruitment of monocytes and Th1-like/CD45RO⁺T cells. *Blood* 2001;**97**:1144–1146.
24. Remick GD. Interleukin-8. *Crit Care Med* 2005;**33**:s646–s647.
25. Waugh JJD, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:6735–6741.
26. Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP 3rd, Toews GB *et al.* Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest* 1990;**86**:1945–1953.
27. Gimbrone MA Jr, Obin MS, Brock AF, Luis EA, Hass PE, Hébert CA *et al.* Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* 1989;**246**:1601–1603.
28. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991;**253**:1278–1280.
29. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of a complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 1991;**253**:1280–1283.
30. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2002;**2**:123–128.
31. Schraufstatter IU, Chung J, Burger M. IL-8 activates endothelial CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;**280**:L1094–L1103.
32. DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 1992;**90**:2123–2129.
33. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993;**268**:25568–25576.
34. Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis* 1996;**127**:263–271.
35. Apostolopoulos J, Davenport P, Tipping PG. Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;**16**:1007–1012.
36. Liu Y, Hultén LM, Wiklund O. Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:317–323.
37. Dje N'Guessan P, Riediger F, Vardarova K, Scharf S, Eitel J, Opitz BS *et al.* Statins control oxidized LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;**29**:380–386.
38. Geisel J, Jödden V, Obeid R, Knapp JP, Bodis M, Herrmann W. Stimulatory effect of homocysteine on interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Clin Chem Lab Med* 2003;**41**:1045–1048.
39. Ryoo SW, Kim DU, Won M, Chung KS, Jang YJ, Oh GT *et al.* Native LDL induces interleukin-8 expression via H₂O₂, p38 kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:185–193.
40. Ito T, Ikeda U, Yamamoto K, Shimada K. Regulation of interleukin-8 expression by HMG-CoA reductase inhibitors in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002;**165**:51–55.
41. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr *et al.* MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999;**398**:718–723.
42. Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL *et al.* IL-8. A mitogen and chemoattractant for smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;**75**:1–7.
43. Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation* 1999;**99**:420–426.
44. Rydberg EK, Salomonsson L, Hultén LM, Norén K, Bondjers G, Wiklund O *et al.* Hypoxia increases 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 protein secretion in human macrophages. *Atherosclerosis* 2003;**170**:245–252.
45. Yang YY, Hu CJ, Chang SM, Tai TY, Leu SJ. Aspirin inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 expression in TNF-alpha stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 2004;**174**:207–213.
46. Kim HY, Kang YJ, Song IH, Choi HC, Kim HS. Upregulation of interleukin-8/CXCL8 in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2008;**31**:515–523.
47. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Perrin A, Pache JC, Velebit V, Dayer JM *et al.* Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:2594–2599.
48. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998;**101**:353–363.
49. Weber C, Kraemer S, Drechsler M, Lue H, Koenen RR, Kapurniotu A *et al.* Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:16278–16283.
50. Boyle EM Jr, Kovacich JC, Hébert CA, Canty TG Jr, Chi E, Morgan EN *et al.* Inhibition of interleukin-8 blocks myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;**116**:114–121.
51. Inoue T, Komoda H, Nonaka M, Kameda M, Uchida T, Node K. Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2008;**124**:319–325.
52. Elmas E, Lang S, Dempfle CE, Kälsch T, Hannak D, Sueselbeck T *et al.* High plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and interleukin-8 (IL-8) characterize patients prone to ventricular fibrillation complicating myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* 2007;**45**:1360–1365.
53. Panichi V, Taccola D, Rizza GM, Consani C, Ghiadoni L, Filippi C *et al.* Interleukin-8 is a powerful prognostic predictor of all-cause and cardiovascular mortality in dialytic patients. *Nephron Clin Pract* 2006;**102**:51–58.
54. Herder C, Baumert J, Thorand B, Martin S, Löwel H, Kolb H *et al.* Chemokines and incident coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984–2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:2147–2152.
55. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M, Ferrer J. Prognostic value of interleukin-8 as a predictor of heart failure in patients with myocardial infarction and percutaneous intervention. *Int J Cardiol* 2006;**111**:158–160.
56. Vogiatzi K, Apostolakis S, Voudris V, Thomopoulou S, Kochiadakis GE, Spandidos DA. Interleukin 8 and susceptibility to coronary artery disease: a population genetics perspective. *J Clin Immunol* 2008;**28**:329–335.
57. Vogiatzi K, Apostolakis S, Voudris V, Thomopoulou S, Kochiadakis GE, Spandidos DA. Interleukin 8 gene polymorphisms and susceptibility to restenosis after percutaneous coronary intervention. *J Thromb Thrombolysis* 2009. Published online ahead of print April 2009, doi:10.1007/s11239-009-0338-y.
58. Kawamura T, Wakusawa R, Okada K, Inada S. Elevation of cytokines during open heart surgery with cardiopulmonary bypass: participation of interleukin 8 and 6 in reperfusion injury. *Can J Anaesth* 1993;**40**:1016–1021.
59. Hummel M, Czerlinski S, Friedel N, Liebenthal C, Hasper D, von Baehr R *et al.* Interleukin-6 and interleukin-8 concentrations as predictors of outcome in ventricular assist device patients before heart transplantation. *Crit Care Med* 1994;**22**:448–454.
60. Kawamura T, Inada K, Okada H, Okada K, Wakusawa R. Methylprednisolone inhibits increase of interleukin 8 and 6 during open heart surgery. *Can J Anaesth* 1995;**42**:399–403.
61. Oz MC, Liao H, Naka Y, Seldomridge A, Becker DN, Michler RE. Ischemia-induced interleukin-8 release after human heart transplantation. A potential role for endothelial cells. *Circulation* 1995;**92**:II428–II432.
62. Burns SA, Newburger JW, Xiao M, Mayer JE Jr, Walsh AZ, Neufeld EJ. Induction of interleukin-8 messenger RNA in heart and skeletal muscle during pediatric cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1995;**92**:II315–II321.
63. Nandate K, Vuylsteke A, Crosbie AE, Messahel S, Oduro-Dominah A, Menon DK. Cerebrovascular cytokine responses during coronary artery bypass surgery: specific production of interleukin-8 and its attenuation by hypothermic cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 1999;**89**:823–828.
64. Wu ZK, Laurikka J, Vikman S, Nieminen R, Moilanen E, Tarkka MR. High postoperative interleukin-8 levels related to atrial fibrillation in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *World J Surg* 2008;**32**:2643–2649.
65. Kanda T, Hirao Y, Oshima S, Yuasa K, Taniguchi K, Nagai R *et al.* Interleukin-8 as a sensitive marker of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996;**77**:304–307.

66. Zhou RH, Shi Q, Gao HQ, Shen BJ. Changes in serum interleukin-8 and interleukin-12 levels in patients with ischemic heart disease in a Chinese population. *J Atheroscler Thromb* 2001;**8**:30–32.
67. Romuk E, Skrzep-Poloczek B, Wojciechowska C, Tomasik A, Birkner E, Wodniecki J *et al.* Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest* 2002;**32**:657–661.
68. Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2006;**17**:699–706.
69. Abe Y, Kawakami M, Kuroki M, Yamamoto T, Fujii M, Kobayashi H *et al.* Transient rise in serum interleukin-8 concentration during acute myocardial infarction. *Br Heart J* 1993;**70**:132–134.
70. Schömig K, Busch G, Steppich B, Sepp D, Kaufmann J, Stein A *et al.* Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;**27**:1032–1037.
71. Riesenberger K, Levy R, Katz A, Galkop S, Schlaeffer F. Neutrophil superoxide release and interleukin 8 in acute myocardial infarction: distinction between complicated and uncomplicated states. *Eur J Clin Invest* 1997;**27**:398–404.
72. de Winter RJ, Manten A, de Jong YP, Adams R, van Deventer SJ, Lie KI. Interleukin 8 released after acute myocardial infarction is mainly bound to erythrocytes. *Heart* 1997;**78**:598–602.
73. Tziakas DN, Chalikias GK, Tentis IK, Stakos D, Chatzikyriakou SV, Mitrousi K *et al.* Interleukin-8 is increased in the membrane of circulating erythrocytes in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J* 2008;**29**:2713–2722.
74. Oda Y, Tsuruta R, Kasaoka S, Inoue T, Maekawa T. The cutoff values of intrathecal interleukin 8 and 6 for predicting the neurological outcome in cardiac arrest victims. *Resuscitation* 2009;**80**:189–193.
75. Mussack T, Briegel J, Schelling G, Biberthaler P, Jochum M. Effect of stress doses of hydrocortisone on S-100B vs. interleukin-8 and polymorphonuclear elastase levels in human septic shock. *Clin Chem Lab Med* 2005;**43**:259–268.
76. Kim CS, Park HS, Kawada T, Kim JH, Lim D, Hubbard NE *et al.* Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)* 2006;**30**:1347–1355.
77. Trøseid M, Lappegård KT, Claudi T, Damås JK, Mørkrid L, Brendberg R *et al.* Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *Eur Heart J* 2004;**25**:349–355.
78. Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Müller MR, Husslein P *et al.* Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:1194–1199.
79. Ganaha F, Kao EY, Wong H, Elkins CJ, Lee J, Modanlou S *et al.* Stent-based controlled release of intravascular angiostatin to limit plaque progression and in-stent restenosis. *J Vasc Interv Radiol* 2004;**15**:601–608.

Interleukin 8 gene polymorphisms and susceptibility to restenosis after percutaneous coronary intervention

Konstantina Vogiatzi · Stavros Apostolakis ·
Vassilis Voudris · Sofia Thomopoulou ·
Georgios E. Kochiadakis · Demetrios A. Spandidos

© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Interleukin-8 is a strong mediator of inflammation and has been implicated in the biochemical pathways involved in a wide range of inflammatory diseases including atherosclerosis. We investigated the potential influence of two common functional polymorphisms of the interleukin (IL)-8 gene: $-251A/T$ and $781C/T$ on susceptibility to in stent restenosis (ISR) following percutaneous coronary intervention (PCI). The hypothesis was tested by screening for the prevalence of the above polymorphisms in 201 coronary artery disease (CAD) patients subjected to PCI and presenting with symptoms or signs of recurrent ischemia. Patients were angiographically re-evaluated and formed the ISR group ($n = 73$) and the non-ISR group ($n = 128$) based on the presence or absence of ISR. One hundred and forty-seven subjects without angiographic evidence of CAD formed a reference control group (non-CAD group). A borderline statistically significant higher frequency of the $TT_{251}TT_{781}$ combined genotype was observed in patients with ISR on re-evaluation compared with patients with normal follow-up angiography. The predominance of

$TT_{251}TT_{781}$ was independent of conventional risk factors for cardiovascular disease. Consequently, $T_{251}T_{781}$ haplotype was significantly more common in the ISR group. The above observations indicate that the genetic diversity of the IL-8 gene influences patient susceptibility to ISR and suggests the implication of IL-8-mediated pathways in the process of ISR. However, the rarity of $T_{251}T_{781}$ haplotype makes any clinical application of the above observations unfeasible.

Keywords Interleukin 8 · Polymorphisms · Coronary artery disease · In stent restenosis

Introduction

The correlation between atherosclerosis and inflammation is well established [1]. Several pro-inflammatory factors have been implicated in the molecular pathways that lead to atherosclerosis [2]. Interleukin 8 (IL-8) or CXCL8 is the prototype member of the CXC chemokine family. It is a strong chemoattractant for neutrophils and T-lymphocytes and is produced by a wide range of cell types in response to various inflammatory stimuli. Interleukin-8 is a strong mediator of inflammation and has been implicated in the biochemical pathways involved in a wide range of inflammatory diseases including atherosclerosis [3, 4].

Disrupted gene expression or altered protein formation of the IL-8 gene, mainly induced by mutations, may contribute positively or negatively to the establishment or progression of coronary artery disease (CAD). Several polymorphisms have been detected in the IL-8 gene, and a common polymorphism in the -251 position ($251A/T$, rs4073) of the promoter region has been associated with the gene's transcriptional activity. The $251A$ allele in a

K. Vogiatzi · S. Apostolakis · D. A. Spandidos (✉)
Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of
Crete, Heraklion, Crete, Greece
e-mail: spandidos@spandidos.gr

V. Voudris · S. Thomopoulou
Department of Cardiology, Onassis Cardiac Surgery Centre,
Athens, Greece

G. E. Kochiadakis
Department of Cardiology, University Hospital of Crete,
Heraklion, Crete, Greece

homozygous state has been associated with an increased expression of IL-8 [5, 6]. Another common polymorphism in position 781 of the IL-8 gene (781C/T, rs2227306) has been associated with altered transcription levels of IL-8. The common haplotype A₂₅₁T₇₈₁ has been found to have the maximum up-regulating effect on IL-8 expression [5]. The two polymorphisms have been evaluated in a wide range of clinical settings and several genotype–phenotype interactions have been established [7–10]. We have investigated a possible influence of IL-8 gene polymorphisms on susceptibility to CAD and we have previously reported an association between a common genotype of the IL-8 gene and a reduced risk for acute coronary syndrome (ACS) in CAD subjects independently of established cardiovascular risk factors [11].

In the present study, we further explored the effects of the two genetic polymorphisms of the IL-8 gene on patient susceptibility to in-stent restenosis (ISR) following percutaneous coronary intervention (PCI).

We hypothesize that an altered IL-8 expression induced by certain genotypes would interfere with susceptibility to ISR. In order to explore the hypothesis a population consisting of CAD patients with ISR after PCI, CAD patients subjected to PCI with normal follow-up angiography and subjects without angiographic evidence of CAD, was genotyped for the two polymorphisms.

Patients and methods

Study population

Patients presenting clinical signs of recurrent ischemia one month to two years after PCI and stent placement were prospectively recruited over a two-year period. Clinical signs of recurrent ischemia were considered: relapse of effort angina, occurrence of ACS, new signs of myocardial ischemia on the stress electrocardiogram, stress echocardiography or SPECT myocardial perfusion imaging. All patients were angiographically re-evaluated and classified in the in-stent restenosis (ISR) and non-in-stent restenosis (non-ISR) group based on the angiographic status of the intervened lesion. One hundred and forty-seven age matched subjects (male:female ratio 2.5:1) without angiographic evidence of CAD form a reference control group (non-CAD group). All of the subjects enrolled were Caucasian. Clinical and epidemiological characteristics are summarized in Table 1.

Clinical definitions

Smoking was defined as a current or prior history of tobacco use. Diabetes was defined as a fasting blood glucose level >126 mg/dl, or treatment with dietary modification, oral hypoglycemic agents or insulin at the time of

Table 1 Demographic and clinical characteristics of patients with clinical signs of recurrent ischemia following percutaneous coronary intervention

	ISR (n = 73)	Non-ISR (n = 128)	Non-CAD (n = 147)
Age mean (\pm SEM)	64 (1.1)	64 (0.8)	62 (1.1)
Male	67 (91.8)	110 (85.9)	105 (71.4)
Hypertension	68 (93.2)	105 (82)	87 (59.2)
Diabetes	38 (52.1)	61 (47.7)	25 (17)
Dyslipidemia	73 (100)	126 (98.4)	99 (67.3)
Smoking	50 (68.5)	71 (55.5)	59 (40.1)
Positive family history	31 (42.5)	54 (42.2)	60 (40.8)
Median time (days) of follow-up CA post PCI	265 (130–553)	285 (184–602)	
Number of diseased vessels			
1	15 (20.5)	36 (28.1)	
2	15 (20.5)	38 (29.7)	
3	43 (59)	54 (42.2)	
Clinical presentation			
Unstable disease	15 (20.5)	29 (22.7)	
Stable disease	58 (79.5)	99 (77.3)	
Type of stent			
BMS	39 (53.4)	54 (42.2)	
DES	33 (45.2)	66 (51.6)	
BMS and DES	1 (1.4)	8 (6.3)	

Values refer to the number of subjects (%), means (\pm SEM) or medians (range)

ISR in-stent restenosis, CAD coronary artery disease, CA coronary angiography, DES drug-eluting stent, BMS bare-metal stent

the study. Hypertension was defined as systolic blood pressure >140 mmHg and/or diastolic pressure >90 mmHg in at least three distinct measurements, or in cases in which such a diagnosis had been made in the past and the patient was being treated with medication or lifestyle modification. For CAD patients, dyslipidemia was defined as treatment with lipid-lowering medication, 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 [14]. Parental history of myocardial infarction was considered as positive family history.

Coronary artery disease was classified as 1, 2 or 3 vessel disease based on the number of major epicardial vessels with >70% lumen stenosis. Based on the clinical presentation of CAD, patients were further classified as suffering from stable disease (silent ischemia or patients with stable angina) or unstable disease (unstable angina or acute myocardial infarction). In-stent restenosis was defined as $\geq 50\%$ diameter reduction of the stented segment on follow-up angiography.

Informed consent was obtained from all the individuals that participated in the study. The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the ethics committee of University Hospital of Crete and Onassis Cardiac Surgery Centre.

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from 10 ml ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated venous blood using the standard phenol/chloroform protocol. Blood samples were taken before catheterization. DNA purity was assessed by a UV/VIS spectrophotometer evaluating the A260/A280 ratio. Genotyping for the 251A/T polymorphism was performed using allele-specific polymerase chain reaction (PCR) as previously described [11]. Results were verified by direct sequencing of the PCR product (Fig. 1). PCR/restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was performed for the detection of the variation 781C/T. Initially, PCR was performed to frame the polymorphic region using primers and conditions as previously described [11]. PCR products were further subjected to digestion with 1 unit of *EcoRI* endonuclease.

Statistical analysis

Genotype distributions for each polymorphism were first compared to values predicted by the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) through χ^2 analysis. Haplotypes were calculated and linkage disequilibrium was measured using the classic statistic, disequilibrium coefficient. Estimation

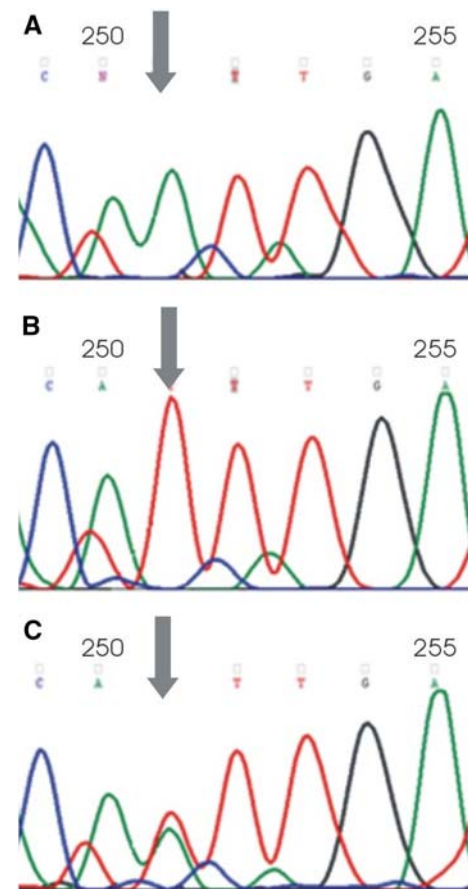


Fig. 1 Representative chromatograms of 251 AA homozygote (a), 251 TT homozygote (b) and an heterozygote (c)

of haplotype frequencies and linkage disequilibrium analysis was performed by *CubeX* analysis software [12].

The correlation of each of the studied polymorphisms to clinical parameters was first evaluated by χ^2 analysis with 2 degrees of freedom. The extent of each genotype's association with the disease was initially estimated by Pearson's χ^2 or Fisher exact test. An adjustment for conventional risk factors of patients such as age, gender, smoking status, diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia and family history, was performed by including these covariates in a logistic regression model. To provide separate odds ratios (ORs) for each genotype, the most common genotype was considered as the reference group. Using our sample size, the study had a validity of 80% to detect a 1.55-fold increase of allele frequencies, assuming a 40% prevalence of the rare allele in the control group and a type I error probability of 0.05. Significant associations were further corrected for multiple testing by applying Bonferroni correction. The significance level was adjusted by dividing this level by the number of tested variables (n).

Numerical values are expressed as the mean \pm SEM, and differences between means were compared by the 2-tailed

unpaired Student's *t*-test. In all cases, $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Analyses were performed using SPSSv10 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Two hundred and one CAD patients (median age 64, male:female ratio 7.4:1) presenting symptoms or clinical signs of ischemia after PCI were recruited. After angiographic re-evaluation, patients were classified into the in-stent restenosis (ISR) group ($n = 73$) or non-in-stent restenosis (non-ISR) group ($n = 128$).

Hardy–Weinberg equilibrium and genetic interaction within the IL-8 gene

The prevalence of $-251A/T$ and $781C/T$ polymorphisms of the IL-8 gene was analyzed in 73 patients with previous PCI presenting with angiographically established ISR, 128 patients subjected to PCI with normal follow-up angiography and 147 subjects without angiographic evidence of CAD. The genotypic and allelic frequencies for the studied variations are shown in Tables 2 and 3. Genotype frequencies of both polymorphisms were in agreement with

Table 2 Genotype frequencies in patients and controls

251 A/T	781 C/T	ISR <i>n</i> (%)	Non-ISR <i>n</i> (%)	Non-CAD <i>n</i> (%)
AA	TT	7 (9.5)	23 (17.9)	15 (10.2)
AA	CT	3 (4.1)	2 (1.6)	9 (6.1)
AA	CC	0	2 (1.6)	6 (4.1)
AT	TT	1 (1.3)	1 (0.8)	2 (1.4)
AT	CT	32 (43.8)	59 (46.1)	59 (40.1)
AT	CC	15 (20.5)	19 (14.8)	16 (10.9)
TT	TT	3 (4.1)*	0*	0*
TT	CT	0	0	2 (1.4)
TT	CC	12 (16.4)	22 (17.2)	38 (25.8)
AA		10 (13.7)	27 (21.1)	30 (20.4)
AT		48 (65.8)	79 (61.7)	77 (52.4)
TT		15 (20.5)	22 (17.2)	40 (27.2)
	CC	27 (37)	43 (33.6)	60 (40.8)
	CT	35 (47.9)	61 (47.7)	70 (47.6)
	TT	11 (15.1)	24 (18.8)	17 (11.6)
Total		73	128	147

ISR in-stent restenosis, CAD coronary artery disease. Values refer to number of subjects (%)

ISR vs. non-ISR: OR = 1.2, 95% CI: 1–1.9, $P = 0.049$ (using as baseline risk the most common genotype, ATCT)

ISR vs. non-CAD: OR = 1.2, 95% CI: 1–1.9, $P = 0.049$ (using as baseline risk the most common genotype, ATCT)

P-values under the cut-off point of statistical significance in all other cases

Table 3 Haplotype frequencies in patients and controls

Haplotype	ISR	Non-ISR	Non-CAD
h1 A ₂₅₁ C ₇₈₁	0.133	0.1	0.128
h2 A ₂₅₁ T ₇₈₁	0.476	0.476	0.518
h3 T ₂₅₁ C ₇₈₁	0.332	0.421	0.338
h4 T ₂₅₁ T ₇₈₁	0.058*	0.004*	0.0159*
Total (n)	146	256	294

ISR in-stent restenosis, CAD coronary artery disease. *n* refers to the number of alleles

* ISR vs. non-ISR: OR = 15.7 95% CI: 1.9–126, $P = 0.001$ (using as baseline risk h4 haplotype)

ISR vs. non-CAD: OR = 3.9, 95% CI: 1.3–12, $P = 0.018$ (using as baseline risk h4 haplotype)

Table 4 Allele frequencies and χ^2 values of Hardy–Weinberg equilibrium in the studied sub-population

	ISR		Non-ISR		Non-CAD		<i>D'</i>	<i>r</i> ²
	<i>f</i>	χ^2 HWE	<i>f</i>	χ^2 HWE	<i>f</i>	χ^2 HWE		
251A	0.465	7.5	0.52	7.1	0.466	0.40	0.92	0.53
781C	0.61	0.004	0.574	0.08	0.646	0.25		
Total (n)	146		256		294			

ISR in-stent restenosis, CAD coronary artery disease, HWE Hardy–Weinberg Equilibrium. *n* refers to number of alleles

those predicted by the Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) in controls. However, genotype frequencies of the 251A/T polymorphism both in the ISR and non-ISR groups deviated from those predicted by the HWE (Table 4). In accordance to our previous observation [11] disequilibrium analysis indicated a strong association between the two loci (Table 4). Four out of nine combined genotypes accounted for >90% of the sample, while haplotype analysis revealed three predominant haplotypes and the less common T₂₅₁T₇₈₁ haplotype, accounting for less than 2% of the total population gene pool (Table 3).

Genotype–phenotype association studies

Genotype–phenotype interactions were evaluated for each genotype as well as for the 4 haplotypes and the 9 combined genotypes. No association was established when we assessed the impact of each of the studied polymorphisms independently on susceptibility to ISR. A combined genotype analysis revealed a statistical significant predominance of the TT₂₅₁TT₇₈₁ genotype (taking as baseline risk the AT₂₅₁CT₇₈₁ genotype) in the ISR group compared to the non-ISR group and the non-CAD group (Odds ratio 1.2 95% Confidence interval 1–1.9, $P = 0.049$). In fact the

TT₂₅₁TT₇₈₁ genotype was only detected in the ISR group. When the TT₂₅₁TT₇₈₁ genotype and conventional cardiovascular risk factors were included in a multiple logistic regression model, the effect of the TT₂₅₁TT₇₈₁ genotype on susceptibility to ISR proved to be independent of conventional cardiovascular risk factors (corrected *P* value = 0.018). However, the predominance of the TT₂₅₁TT₇₈₁ genotype in the ISR group did not retain statistical significance when Bonferroni correction was applied for multiple testing (adjusted significance for 9 tested variables: *P* = 0.3).

Consequently, the T₂₅₁T₇₈₁ haplotype (h4) was significantly more common in the ISR group than in non-ISR and non-CAD group. In fact, using as baseline risk the most common haplotype A₂₅₁T₇₈₁ (h2), the predominance of the h4 in the ISR group produced the strongest statistical significance (odds ratio = 15.7; 95% confidence interval: 1.9–126; *P* = 0.001). The latter observation retained statistical significance after applying Bonferroni correction (adjusted significance for 4 tested variables: *P* = 0.004).

No phenotype–genotype or phenotype–haplotype association was detected between the studied genetic variations and clinical presentation of CAD or the angiographic severity of CAD.

No associations were established between conventional cardiovascular risk factors and risk for ISR, and between the studied genotypes and conventional risk factors of cardiovascular disease; nor did any other genotype grouping give statistically significant results.

Discussion

This is the first study assessing the impact of –251A/T and 781C/T polymorphisms of the IL-8 gene on patient susceptibility to ISR. Our findings demonstrated a positive association between a rather uncommon genotype of the IL-8 gene and ISR. The TT₂₅₁TT₇₈₁ genotype was significantly more common in the ISR group, which exhibited a significantly higher frequency of the T₂₅₁T₇₈₁ haplotype. The latter association was established despite the small sample size and the low frequency of the T₂₅₁T₇₈₁ genotype. Undoubtedly the observed phenotype/genotype interaction is not expected to be clinically applicable in prognostic or therapeutic decision-making due to the relatively low frequency of the TT₂₅₁TT₇₈₁ genotype. It is, however, indicative of the implication of IL-8-mediated pathways in the pathogenesis of ISR.

The advent of stent technology has revolutionized the field of interventional cardiology by reducing the incidence of restenosis after balloon angioplasty. However, ISR remains a principal drawback with substantial clinical implications [12]. Several factors contribute to ISR

including lesion- or procedure-; patient- and genetic-related factors [13–15].

Neointimal proliferation is the main mechanism involved in the development of stent restenosis and a number of previous investigations have consistently suggested that inflammation plays a significant role in the process [13].

Several investigators have assessed the impact of genetic alterations mainly single nucleotide polymorphisms (SNPs) on patient susceptibility to ISR [16–19]. Most recently Shah et al., [20] assessed the impact of 39 candidate atherosclerosis genes on susceptibility to ISR in 49 BMS-treated patients with subsequent ISR and 39 matched controls. They concluded that ALOX5AP, a gene within the inflammatory leukotriene pathway, which was previously associated with coronary atherosclerosis, is also associated with in-stent restenosis. Similarly, Oguri et al., [21] in a population comprised of 28 subjects who developed ISR two or more times and 499 subjects without restenosis, genotyped for 142 polymorphisms in 121 candidate genes. They concluded that the –55C/T polymorphism of the uncoupling protein 3 gene (UCP3) may contribute to the assessment of the genetic risk for recurrent ISR. In the field of inflammatory mediators, Miranda-Malpica et al., [22] explored the association between IL-1 family gene polymorphisms and the risk for restenosis after coronary stent placement in 165 patients who underwent coronary artery stenting. Basal and follow-up coronary angiography were analyzed in search of angiographic restenosis. The above-mentioned authors concluded that IL-1B-511 polymorphism may be involved in the development of restenosis following coronary stent placement. Several other studies have resulted in a positive or negative association between certain genotypes and susceptibility to restenosis post-PCI.

Interleukin-8 has been implicated in the pathways involved in stent restenosis by several investigators in different experimental settings. Most recently, Caixeta et al. reported that patients who experienced restenosis had higher levels of IL-8 at 6 h after stent placement than those without restenosis [23]. Similarly, Qi et al. reported that increased levels of IL-8 after PCI are a powerful prognostic factor for cardiac events and restenosis. The higher the peak level of post-procedure IL-8, the lower the event-free survival observed [24]. These observations are in accordance with our results and support a pivotal role of IL-8 in restenosis.

Nevertheless, there are several limitations in the study that may diminish the significance of the reported results. It is important to note that the study was conducted in a relatively small population. The small sample size significantly reduced the validity of the study and minimized the prospect of establishing negative associations. This is a

common drawback in studies assessing genetic predisposition to ISR mainly because stent placement (particularly DES) has significantly reduced the incidence of restenosis. Furthermore, the *gold standard* in the diagnosis of ISR is follow-up angiography which is an invasive procedure that is not easily applied for experimental purposes. To overcome these setbacks we included patients presenting with clinical evidence of restenosis one month to two years after successful PCI. In this clinically defined group, the rate of restenosis was significantly higher (35.6%) than the overall expected rate after PCI.

Another discrepancy in our findings is that if IL-8 was implicated in the ISR process we would expect more pronounced results regarding the genotypes with the strongest functional consequences, $-251AA$ and $781TT$. However, differences were noted only regarding the $TT_{251}TT_{781}$ combined genotype and the $T_{251}T_{781}$ haplotype. The up-regulating effect of the $781T$ allele is in agreement with our finding, while the up-regulating effect of the $-251A$ allele has been observed only in the homozygote state. There is also much disagreement in the literature regarding the clinical consequences of $-251A/T$ and $781C/T$ on inflammatory diseases. Furthermore, the impact of the two variations on the transcriptional activity of the IL-8 gene has largely been studied in respiratory epithelial cells in a pulmonary disease setting and not in the field of endothelial dysfunction or atherosclerosis [5].

Another limitation of the study is that it consists of a rather heterogeneous population. The fact that both BMS- and DES-treated patients were included is a complicating factor. The pathophysiological background of restenosis might differ in BMS and DES treated vessels [25]. Another confounding factor is that the presenting symptoms and signs of the recruited subjects varied, from asymptomatic patients to those presenting with acute coronary syndromes. Moreover, the fact that the study included only patients presenting symptoms or signs of restenosis is a limitation. Patients with asymptomatic restenosis or restenosis not producing ischemia in non-invasive tests might have been overlooked.

Finally, an observation that needs explanation is the significant deviation of $251A/T$ allele frequencies from those predicted by the HWE in both the ISR and non-ISR groups. Violation of HWE can be the result of genotyping errors, ethnic diversity or over-selected study populations. In our study protocol, genotyping was repeated twice and the validity of allele-specific PCR was re-evaluated by direct sequencing of the randomly selected samples. However, no deviation was observed between the allele-specific PCR and sequencing results. Ethnic diversity was also discarded as a possible cause of HWE disassociation since all the study participants were Caucasians. However, our study population, did not consist of randomly selected

subjects from the general population, but were subjects with significant CAD subjected to PCI and presented with clinical evidence of restenosis one month to two years later. It is thus the over-selected population that may have resulted in the deviation from HWE. In a previous study of ours, conducted in a less selected population sample (CAD patients and CAD-free controls), the allele frequencies of the two polymorphisms did not deviate from the ones predicted by HWE [11].

Conclusions

In conclusion, we demonstrated a phenotype/genotype interaction between a specific IL-8 gene genotype and susceptibility to ISR. This finding is in agreement with the functional consequences of $781T$ polymorphism and support the pivotal role of IL-8 chemokine in the development of ISR.

References

- Ross R (1999) Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115–126. doi:[10.1056/NEJM199901143400207](https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207)
- Luster AD (1998) Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436–445. doi:[10.1056/NEJM199802123380706](https://doi.org/10.1056/NEJM199802123380706)
- Boisvert WA, Curtiss LK, Terkeltaub RA (2000) Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in atherosclerosis. *Immunol Res* 21:129–137. doi:[10.1385/IR:21:2-3:129](https://doi.org/10.1385/IR:21:2-3:129)
- Apostolakis S, Papadakis EG, Krambovitis E, Spandidos DA (2006) Chemokines in vascular pathology. *Int J Mol Med* 17:691–701
- Hacking D, Knight JC, Rockett K et al (2004) Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associated with respiratory syncytial virus disease susceptibility. *Genes Immun* 5:274–282. doi:[10.1038/sj.gene.6364067](https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364067)
- Ohyauchi M, Imatani A, Yonechi M et al (2005) The polymorphism interleukin 8–251 A/T influences the susceptibility of *Helicobacter pylori* related gastric diseases in the Japanese population. *Gut* 54:330–335. doi:[10.1136/gut.2003.033050](https://doi.org/10.1136/gut.2003.033050)
- Kamali-Sarvestani E, Aliparasti MR, Atefi S (2007) Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) $-251T/A$ and CXCR2 $+1208C/T$ gene polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma* 54:484–489
- Ben Nasr H, Chahed K, Mestiri S, Bouaouina N, Snoussi K, Chouchane L (2007) Association of IL-8 ($-251T/A$) polymorphism with susceptibility to and aggressiveness of nasopharyngeal carcinoma. *Hum Immunol* 68:761–769. doi:[10.1016/j.humimm.2007.06.006](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2007.06.006)
- Wei YS, Lan Y, Tang RG et al (2007) Single nucleotide polymorphism and haplotype association of the interleukin-8 gene with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Immunol* 125:309–317. doi:[10.1016/j.clim.2007.07.010](https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.07.010)
- McCarron SL, Edwards S, Evans PR et al (2002) Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 62:3369–3372
- Vogiatzi K, Apostolakis S, Voudris V, Thomopoulou S, Kochiadakis GE, Spandidos DA (2008) Interleukin 8 and susceptibility

- to coronary artery disease: a population genetics perspective. *J Clin Immunol* 28:329–335. doi:[10.1007/s10875-008-9194-3](https://doi.org/10.1007/s10875-008-9194-3)
12. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN (2007) Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool ‘CubeX’. *BMC Bioinform* 8:428. doi:[10.1186/1471-2105-8-428](https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-428)
 13. Hoffmann R, Mintz GS (2000) Coronary in-stent restenosis-predictors, treatment and prevention. *Eur Heart J* 21:1739–1749. doi:[10.1053/euhj.2000.2153](https://doi.org/10.1053/euhj.2000.2153)
 14. Mitra AK, Agrawal DK (2006) In stent restenosis: bane of the stent era. *J Clin Pathol* 59:232–239. doi:[10.1136/jcp.2005.025742](https://doi.org/10.1136/jcp.2005.025742)
 15. Third Joint Task Force of European, other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (2003) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 10:1–78
 16. Petrovic D, Peterlin B (2005) Genetic markers of restenosis after coronary angioplasty and after stent implantation. *Med Sci Monit* 11:RA127–RA135
 17. Kastrati A, Koch W, Berger PB et al (2000) Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 36:2168–2173. doi:[10.1016/S0735-1097\(00\)01014-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)01014-7)
 18. Humphries S, Bauters C, Meirhaeghe A, Luong L, Bertrand M, Amouyel P (2002) The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. *Eur Heart J* 23:721–725. doi:[10.1053/euhj.2001.2895](https://doi.org/10.1053/euhj.2001.2895)
 19. Ferrero V, Ribichini F, Matullo G et al (2003) Estrogen receptor-alpha polymorphisms and angiographic outcome after coronary artery stenting. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2223–2228. doi:[10.1161/01.ATV.0000101181.81022.BF](https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000101181.81022.BF)
 20. Shah SH, Hauser ER, Crosslin D et al (2008) ALOX5AP variants are associated with in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis* (Epub ahead of print)
 21. Oguri M, Kato K, Hibino T et al (2007) Identification of a polymorphism of UCP3 associated with recurrent in-stent restenosis of coronary arteries. *Int J Mol Med* 20:533–538
 22. Miranda-Malpica E, Martínez-Rios MA, Fragoso JM et al (2008) The interleukin 1B-511 polymorphism is associated with the risk of developing restenosis after coronary stenting in Mexican patients. *Hum Immunol* 69:116–121. doi:[10.1016/j.humimm.2007.12.003](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2007.12.003)
 23. Caixeta AM, Brito FS Jr, Costa MA, Serrano CV Jr, Petriz JL, Da Luz PL (2007) Enhanced inflammatory response to coronary stenting marks the development of clinically relevant restenosis. *Catheter Cardiovasc Interv* 69:500–507. doi:[10.1002/ccd.21007](https://doi.org/10.1002/ccd.21007)
 24. Qi X, Li S, Li J (2003) The prognostic value of IL-8 for cardiac events and restenosis in patients with coronary heart diseases after percutaneous coronary intervention. *Jpn Heart J* 44:623–632. doi:[10.1536/jhj.44.623](https://doi.org/10.1536/jhj.44.623)
 25. Gogo PB Jr, Schneider DJ, Watkins MW, Terrien EF, Sobel BE, Dauerman HL (2005) Systemic inflammation after drug-eluting stent placement. *J Thromb Thrombolysis* 19:87–92. doi:[10.1007/s11239-005-1378-6](https://doi.org/10.1007/s11239-005-1378-6)

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο	ΒΟΓΙΑΤΖΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ
Διεύθυνση	ΑΓ. ΚΥΡΙΑΚΗΣ 28, ΝΑΥΠΛΙΟ, ΕΛΛΑΔΑ
Τηλέφωνο	2752400893 6973244054
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο	ntinavog@yahoo.gr
Υπηκοότητα	Ελληνική
Ημερομηνία γέννησης	13-09-1980

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

- Ιούλιος 2012-
Ειδίκευση στο ειδικό μέρος της Καρδιολογίας- Εκπαίδευση στην Καρδιολογική Κλινική του Γ. Ν. Αργους. Συμμετοχή στις εργασίες της κλινικής, παρακολούθηση Τακτικού Παθολογικού Ιατρείου και εκπαίδευση στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών καθώς και τέλεση εφημεριών. Εκμάθηση πραγματοποίησης Υπερήχων Καρδιάς και Δοκιμασιών Κοπώσεως
- Σεπτέμβριος 2009-
Ιούλιος 2012
Ειδίκευση στο γενικό μέρος της Καρδιολογίας- Εκπαίδευση στην Παθολογική Κλινική του Γ. Ν. Αργους. Συμμετοχή στις εργασίες της κλινικής, παρακολούθηση Τακτικού Παθολογικού Ιατρείου και εκπαίδευση στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών καθώς και τέλεση εφημεριών
- Ιούλιος 2009
Συμμετοχή στο **CBCS/ESC Summer School on Cardiovascular Sciences: 'From Basic Mechanisms to Clinical Application'**
- Δεκέμβριος 2006 -
Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής
«Ο ρόλος της χημοκίνης CXCL8 (IL-8) και των υποδοχέων της CXCR και CXCR2 στην παθογένεια της στεφανιαίας νόσου»
Εργαστήριο Ιολογίας
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης
Επιβλέπων Καθηγητής: Καθηγητής κ. Σπαντίδος Δημήτριος
Μέλη τριμελούς επιτροπής: Επίκουρος καθηγητής κ. Σουρβίνος Γεώργιος και
Επίκουρος καθηγητής κ. Κοχιαδάκης Γεώργιος.
Μοριακές Τεχνικές: DNA extraction, PCR, FACS
- Συμμετοχή σε ερευνητική εργασία με θέμα:
«Γενετική προδιάθεση σε επαναστένωση μετά από διαδερμική ενδοστεφανιαία παρέμβαση. Ο ρόλος γενετικών πολυμορφισμών χημοκινών και των υποδοχέων τους.»

Σεπτέμβριος 1999 -
Αύγουστος 2006

Πανεπιστημιακή Εκπαίδευση

Πτυχίο Ιατρικής. Βαθμός Πτυχίου: Λίαν καλώς

Τμήμα Ιατρικής. Σχολή Επιστημών Υγείας.
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
Προκλινικά- Εργαστηριακά Μαθήματα (3 έτη)
Κλινικές- Πρακτική άσκηση (3 έτη)

1995-1998

Δευτεροβάθμια Εκπαίδευση.
Απόφοιτος Λυκείου Άνοιξης Αττικής.
Βαθμός απολυτηρίου: 18 ¹⁰/₁₁

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Σεπτέμβριος-
Οκτώβριος 2006

Εθελοντική παρακολούθηση των Εξωτερικών Ακτινολογικών Ιατρείων του 1^{ου} Νοσοκομείου ΙΚΑ Αθηνών (Τμήμα Υπερήχων).
Εκπαίδευση στην πραγματοποίηση και γνωμάτευση Υπερήχων και Ακτινογραφιών (με/ χωρίς χρήση σκιαγραφικού μέσου)

ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Μάιος 2010

Tsapaki A, Zaravinos A, Apostolakis S, Voudris K, Vogiatzi K, Kochiadakis GE, Spandidos DA.
Genetic variability of the distal promoter of the ST2 gene is associated with angiographic severity of coronary artery disease.
(Article published by J Thromb Thrombolysis. 2010 Oct;30(3):365-71)

Δεκέμβριος 2009

Apostolakis S, Vlata Z, Vogiatzi K, Krambovitis E, Spandidos DA.
Angiotensin II up-regulates CX3CR1 expression in THP-1 monocytes: impact on vascular inflammation and atherogenesis.
(Article published by J Thromb Thrombolysis. 2010 May;29(4):443-8)

Δεκέμβριος 2008

Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA.
Interleukin 8 and cardiovascular disease.
(Article published by Cardiovasc Res. 2009 Dec 1;84(3):353-60)

Ιούνιος 2008

Konstantina Vogiatzi, Stavros Apostolakis, Vassilis Voudris, Sofia Thomopoulou, Georgios E Kochiadakis and Demetrios A Spandidos
Interleukin 8 gene polymorphisms and susceptibility to Restenosis after Percutaneous Coronary Intervention
(Article published by J Thromb Thrombolysis. 2010 Jan;29(1):134-40)

Φεβρουάριος 2008

Konstantina Vogiatzi, Vassilios Voudris, Stavros Apostolakis, Apostolos Zaravinos, Sofia Thomopoulou, Georgios E Kochiadakis and Demetrios A Spandidos
Genetic Diversity of RANTES gene promoter and susceptibility to Coronary Artery Disease and Restenosis
(Article published by Thromb Res. 2009 Feb 6)

Ιούλιος 2008

Konstantina Vogiatzi, Stavros Apostolakis, Vassilios Voudris, Sophia Thomopoulou, Georgios E Kochiadakis and Demetrios A Spandidos
Interleukin 8 and susceptibility to coronary artery disease: A population genetics perspective.
(article published by
J Clin Immunol. 2008 Jul;28(4):329-35. Epub 2008 Apr 2.)

Απρίλιος 2008

Stavros Apostolakis, Konstantina Vogiatzi, Elias Krambovitis and Demetrios A Spandidos
IL-1 Cytokines in cardiovascular disease. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications. Review
(article published by
Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2008 Apr;6(2):150-8)

Δεκέμβριος 2005

Εργασία πάνω στα **Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα** (συγκέντρωση βιβλιογραφίας και παρουσίαση περιστατικού στα πλαίσια της τρίμηνης εκπαίδευσης στην Παθολογία 6^{ου} έτους).

Σεπτέμβριος 2005-
Νοέμβριος 2005

Εργασία σχετικά με την παιδική διατροφή με τίτλο «**ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ**» κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης στην αντίστοιχη κλινική (Παίδων Αγ. Σοφία) του Παν/μίου Αθηνών.

10/2011: 10th Congress of the European Federation of Internal Medicine

Posters **ABDDOMINAL WALL HEMATOMA AS A RESULT OF ORAL ANTICOAGULANT TREATMENT,**

A CASE OF COINFECTION FROM PULMONARY TUBERCULOSIS AND INFLUENZA A (H1N1) VIRUS και

SYMPTOMATOLOGY FROM THE GASTROINTESTINAL SYSTEM AS THE FIRST SIGN OF MENINGITIS FROM LISTERIA

04/2011: 20ο Συνέδριο Ημέρες Παθολογίας

Poster **Q FEVER AND COMPLETE BLOOD COUNT**

10/2010: 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας

Poster **ΕΚΣΕΣΗΜΑΣΜΕΝΟ ΟΙΔΗΜΑ ΣΤΑΦΥΛΗΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΙΣΠΝΟΗ ΧΥΜΟΥ ΑΠΟ ECBALIUM ELATERIUM (ΠΙΚΡΑΓΓΟΥΡΙΑ)**

10/2010: 9^ο ΠΑΜΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΙΑΚΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

Poster **Κακότηες Νευροληπτικό Σύνδρομο**

09/2009: ESC Congress 2009

Posters **RANTES gene promoter polymorphisms and susceptibility to coronary artery disease and restenosis after percutaneous coronary intervention** και

Polymorphisms of the interleukin 8 gene and restenosis after percutaneous coronary intervention

07/2009: CBCS/ESC Summer School on Cardiovascular Sciences: 'From Basic Mechanisms to Clinical Application'

Poster **INTERLEUKIN 8 AND RANTES GENE POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO RESTENOSIS AFTER PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION**

10/2008: 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine.

Συμμετοχή με poster με τίτλο **GENETIC DIVERSITY OF RANTES GENE PROMOTER AND SUSCEPTIBILITY TO CORONARY ARTERY DISEASE AND RESTENOSIS.**

10/2007: 12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine and Cancer Chemoprevention Symposium.

Συμμετοχή με poster με τίτλο **INTERLEUKIN 8 GENE POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO CORONARY ARTERY DISEASE. A VIEW THROUGH POPULATION GENETICS.**

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ / ΒΡΑΒΕΙΑ

Απρίλιος 2008

Υποτροφία **Ιδρύματος Μανασάκη**

Ακαδ. Έτος 2007-2008

Οκτώβριος 2008

Βραβείο **Ελληνικής Καρδιολογικής Εταιρείας**

για την ερευνητική εργασία με θέμα

«IL-8 και ρόλος αυτής στην παθογένεια της Σταφαναϊάς Νόσου»
συνοδευόμενο από το χρηματικό ποσό των 8000ευρώ για την αγορά υλικοτεχνικού εξοπλισμού.

ΓΝΩΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

- DNA-RNA extraction
- PCR (ASO-PCR / PCR RFLP)
- Χειρισμός κυτταροκαλλιεργειών
- FACS (Κυτταρομετρία ροής)
- ELISA

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΠΕΙΡΑ

2000- 2003

Ιδιαίτερα μαθήματα σε μαθητές Γυμνασίου, Λυκείου στα μαθήματα: Μαθηματικά, Φυσική (Γεν. Παιδείας- Κατεύθυνσης), Χημεία (Γεν. Παιδείας- Κατεύθυνσης)

Μαθήματα σε φροντιστήριο μέσης εκπαίδευσης:
Χημεία Γεν. Παιδείας και Κατεύθυνσης σε μαθητές Β΄ και Γ΄ Λυκείου.

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ.

ΜΗΤΡΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ

Ελληνικά

ΆΛΛΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Ικανότητα ανάγνωσης
- Ικανότητα γραφής
- Ικανότητα ομιλίας

Αγγλικά

Proficiency (University of Cambridge) - Grade “C”

Εξαιρετικό

Εξαιρετικό

Εξαιρετικό

Πιστοποιητικό Επάρκειας γνώσης της Αγγλικής γλώσσας από το Υπ. Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων (Φεβρουάριος 1999).

Γερμανικά

Mittelstufe (Goethe Institut) - “Befriedigend”

- Ικανότητα ανάγνωσης
- Ικανότητα γραφής
- Ικανότητα ομιλίας

Καλό

Καλό

Καλό

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

09/2011: ESC Congress 2011

10/2010: 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας

10/2008: 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine.

Μέλος οργανωτικής επιτροπής.

10/2007: 12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine and Cancer Chemoprevention Symposium.

Μέλος της οργανωτικής επιτροπής.

05/2005: Παρακολούθηση 2^{ου} Ετησίου Επιστημονικού Συνεδρίου Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

12/2004: Παρακολούθηση 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης.

03/2001: Παρακολούθηση Διεθνούς Συνεδρίου ΠΡΟΛΗΨΗΣ & ΈΓΚΑΙΡΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΓΙΑ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ. ΔΙΕΘΝΗΣ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ. Της Ελληνικής Αντικαρκινικής Εταιρείας & της UICC

12/2000: Παρακολούθηση Πανελληνίου Συνεδρίου ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ της πανελλήνιας ένωσης Βιολόγων.

05/2000: Παρακολούθηση Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου.

11/1999: Παρακολούθηση Ημερίδας «ΒΙΟΗΘΗΚΗΣ» της Επιστημονικής Εταιρείας Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος

**ΚΑΛΙΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ
ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ**

1999- 2006

Συμμετοχή σε φοιτητική θεατρική ομάδα του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Οργάνωση παραστάσεων, παρακολούθηση μαθημάτων υποκριτικής, συμμετοχή σε πέντε παραστάσεις, ενασχόληση με την κατασκευή σκηνικών, κοστούμιών, μακιγιάζ.

Ενασχόληση με το οργανωτικό πλαίσιο της ομάδας, τις δημόσιες σχέσεις, την εξασφάλιση οικονομικών πόρων και την κατάρτιση προϋπολογισμών.

Παρακολούθηση μαθημάτων σύγχρονου χορού και συμμετοχή σε χοροθεατρική παράσταση.

Δεκέμβριος 2006 –
Ιούνιος 2009

Συμμετοχή στη χορευτική ομάδα του Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Αργεντινικού Τάνγκο.

Συμμετοχή στην οργάνωση και σκηνοθεσία της ετήσιας παράστασης.

Δεκέμβριος 2009-

Παρακολούθηση μαθημάτων Φωνητικής και Λυρικού τραγουδιού στο Ωδείο Ναυπλίου.

Παρακολούθηση μαθημάτων Jazz πιάνου και αρμονίας στο Ωδείο Ναυπλίου.

Πραγματοποίηση συναυλιών στα πλαίσια της εκμάθησης.