

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΑΓΓΕΙΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘ. ΑΣΤΕΡΙΟΣ ΚΑΤΣΑΜΟΥΡΗΣ**

**ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΠΑΘΕΙΑ ΤΩΝ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΜΥΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ
ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΝΟΣΟ**

Ηρακλής Η. Πιπίνος

Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδες

A. ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
-------------------------	----------

B. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	5
-----------------------------	----------

Δημογραφικά στοιχεία

Κλινική εικόνα

Αιτιοπαθογένεια

Μιτοχονδριακές αλλοιώσεις σε σκελετικούς μυς ασθενών με
περιφερική αρτηριακή νόσο

Ανασκόπηση δομής και λειτουργίας των μιτοχονδρίων

Ανασκόπηση του βιοενεργητικού μεταβολισμού των μυών

Γ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
------------------------------	-----------

ΠΡΩΤΗ ΜΕΛΕΤΗ: Η Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού
συντονισμού καταδεικνύει παθολογική μιτοχονδριακή λειτουργία

στους χωλαίνοντες μυς ασθενών με αρτηριακή αποφρακτική νόσο..... 23

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

ΜΕΘΟΔΟΙ 1^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 1^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

ΔΕΥΤΕΡΗ ΜΕΛΕΤΗ: Η πεντοξιφυλλίνη αντιστρέφει την
παθολογική μιτοχονδριακή λειτουργία των χωλαινόντων μυών

ασθενών με αρτηριακή αποφρακτική νόσο 39

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 2^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

ΜΕΘΟΔΟΙ 2^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 2^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

ΤΡΙΤΗ ΜΕΛΕΤΗ: Βιοχημικές μέθοδοι καταδεικνύουν παθολογική λειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνοής στους σκελετικούς μυς ασθενών με περιφερική αρτηριακή νόσο.....	54
ΕΙΣΑΓΩΓΗ 3 ^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ	
ΜΕΘΟΔΟΙ 3 ^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 3 ^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ 3 ^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ	
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	64
Ε. ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ABSTRACT.....	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΤΗΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗ.....	74
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	80

Στη γυναίκα μου Κωστούλα για τη δύναμη που μου χαρίζει η αρετή της

**Στους γονείς μου Ηλία και Μαργαρίτα και στην αδερφή μου Πελαγία γιατί η αγάπη και οι
προσενχές τους με στηρίζουν στον μακρινό τόπο**

A. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο βασικός υπεύθυνος μηχανισμός για τις κλινικές εκδηλώσεις (διαλείπουσα χωλότητα, κρίσιμη ισχαιμία/γάγγραινα) της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας (ΠΑΑ) είναι η ελαττωμένη αιματική παροχή εξ αιτίας στενώσεων/αποφράξεων στις αρτηρίες που τροφοδοτούν το κάτω μέλος. Παρά τον ξεκάθαρο ρόλο της ελαττωμένης αρτηριακής ροής στις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, νεότερες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει μια σειρά από σημαντικές μεταβολικές διαταραχές στους σκελετικούς μυς των κάτω μελών των αρτηριοπαθών. Οι παθολογικές αυτές μεταβολές σχετίζονται με τη βιολογία των μιτοχονδρίων στο ισχαιμικό μέλος και φαίνεται ότι συνιστούν έναν δεύτερο μηχανισμό με σημαντική συμβολή στην κλινική παθοφυσιολογία της ΠΑΑ.

Συγκεκριμένα, τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι η ΠΑΑ σχετίζεται με μεταβολές στη δομή, το γενετικό υλικό και τη σύνθεση των μιτοχονδρίων στους ισχαιμικούς σκελετικούς μυς. Το κατά πόσο οι μεταβολές αυτές αντιστοιχούν σε βελτιωμένη ή επιδεινωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία δεν έχει ερευνηθεί. Αναγνωρίζοντας τη σημασία αυτού του θέματος σχεδιάσαμε ένα τριετές διδακτορικό πρόγραμμα με κύριο στόχο τη διερεύνηση της λειτουργικής σημασίας αυτών των μιτοχονδριακών μεταβολών, καθώς και της παθοβιολογίας τους.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Αστέριο Κατσαμούρη που με τίμησε με την εμπιστοσύνη του, ώστε να εργαστώ στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρωτόκολλο για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Ο καθηγητής Α. Κατσαμούρης είχε τη συνεχή επιστημονική επίβλεψη της εργασίας και συμπαραστάθηκε πολύπλευρα στην οργάνωση και υλοποίηση του σύνολου ερευνητικού προγράμματος. Είμαι πεπεισμένος ότι χωρίς την πολύτιμη συμβολή του η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής θα αποτελούσε απραγματοποίητο όνειρο. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη φοιτήτρια ιατρικής Γεωργία Ανδρουτσοπούλου και τον ειδικευόμενο χειρουργικής Γιώργο Πισιμίση για τη βοήθειά τους στη μεταφορά κειμένων από την Αγγλική γλώσσα και τον ειδικευόμενο χειρουργικής Δημήτρη Τοπαλίδη για τη βοήθειά του στη γλωσσική επιμέλεια του τελικού κειμένου.

B. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Δημογραφικά στοιχεία

Η περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια (ΠΑΑ) είναι σύνθετος αποτέλεσμα της αθηρωματικής στένωσης/απόφραξης των αρτηριών που αρδεύουν τα κάτω μέλη. Η νόσος είναι σχετικά συχνή με επιπολασμό περίπου 5% σε άτομα άνω των 50 ετών (Criqui, Fronek et al. 1985; Hiatt, Hoag et al. 1995). Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με ΠΑΑ είναι μεγαλύτεροι των σαράντα και οι μισοί από αυτούς μεγαλύτεροι των εβδομήντα ετών. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής 8,4 εκατομμύρια ασθενών πάσχουν από ΠΑΑ, ενώ κάθε χρόνο 100.000 επεμβάσεις χειρουργικής επαναγγείωσης και 50.000 ακρωτηριασμοί εκτελούνται για τη θεραπεία ασθενών σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Με την αναμενόμενη αύξηση της μέσης ηλικίας του πληθυσμού, η νόσος των περιφερικών αρτηριών αναμένεται να συνεχίσει να είναι μια πολύ σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας (Widmer, Greensher et al. 1964; Imparato, Kim et al. 1975; Cronenwett, Warner et al. 1984; Jonason and Ringqvist 1985; Rosenbloom, Flanigan et al. 1988; Dormandy, Mahir et al. 1989).

Κλινική εικόνα

Το 50% των ασθενών με ΠΑΑ νόσο βρίσκεται σε ένα λανθάνον στάδιο με βασικά συμπτώματα το αίσθημα αιμωδίας, ψύχους και εύκολης κόπωσης (Mohler 2003). Οι περισσότεροι από αυτούς τους ασθενείς αποδίδουν τα συμπτώματα σε «κακή κυκλοφορία» και προχωρημένη ηλικία και δεν αναζητούν ιατρική φροντίδα. Περίπου 45% των ασθενών με ΠΑΑ παρουσιάζονται στο γιατρό με διαλείπουσα χωλότητα (αίσθημα μυϊκής κράμπας, σύσφιξης ή πόνου που εμφανίζεται μετά από σύντομη βάρδια και υποχρεώνει τον ασθενή να σταματήσει). Η χωλότητα σχετίζεται με σημαντική λειτουργική δυσχέρεια και υποβάθμιση της ποιότητας ζωής και τυπικά περιορίζει τη μέγιστη ικανότητα βάρδιας στο 30% περίπου της ικανότητας βάρδιας της κατά ηλικία αντιστοίχου ομάδας ελέγχου (Hiatt and Nehler 2001; Hirsch, Criqui et al. 2001). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ασθενείς να αδυνατούν να εκτελέσουν ένα μεγάλο αριθμό από τις επαγγελματικές και ψυχαγωγικές τους δραστηριότητες. Το υπόλοιπο 5% παρουσιάζεται με κρίσιμη ισχαιμία του κάτω μέλους η οποία εκδηλώνεται με άλγος ανάπαυσης (έντονη δερματική

και ιστική ισχαιμία και ισχυρό διαρκή πόνο που ανθίσταται στα αναλγητικά) και απώλεια ιστού (έλκη και γάγγραινα).

Η ΠΑΑ συνδέεται με πολύ υψηλό δείκτη θνησιμότητας (Belch, Topol et al. 2003). Το 50% των ασθενών αυτών πεθαίνουν στα επόμενα 10 χρόνια από τη διάγνωση, ενώ το 15% των ασθενών με συμπτωματική ισχαιμία οδηγούνται σε ακρωτηριασμό με μεγάλη, τις περισσότερες φορές, αναπηρία. Η βαρύτερη πρόγνωση της νόσου επιβάλλει την ανίχνευσή της σε πρώιμο στάδιο, πριν δηλαδή από την εμφάνιση επιπλοκών (Dawson, Hiatt et al. 2002). Με την έγκαιρη διάγνωση της αρτηριοπάθειας σε σιωπηλό ή ακόμη λανθάνον στάδιο και την εφαρμογή κατάλληλης αντιμετώπισης μπορεί να επιτευχθεί αναστολή της επιδείνωσης της νόσου με ευνοϊκότερη πρόγνωση μακροπρόθεσμα (Hirsch, Gloviczki et al. 2004).

Αιτιοπαθογένεια

Ο βασικός αιτιοπαθογενετικός μηχανισμός στην ΠΑΑ είναι η ελαττωμένη αιματική παροχή εξ αιτίας στενώσεων/αποφράξεων στις αρτηρίες που τροφοδοτούν το κάτω μέλος με αίμα. Παρά το σαφή ρόλο της ελαττωμένης αρτηριακής ροής στις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, μια σειρά από νεότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η βαρύτητα των εκδηλώσεων της δε μπορεί να εξηγηθεί μόνο στη βάση της περιορισμένης αιματικής παροχής (Pernow and Zetterquist 1968; Gardner, Skinner et al. 1992). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η χειρουργική επαναιμάτωση δεν αποκαθιστά πλήρως την απόδοση των ασθενών κατά την άσκηση, (Regensteiner, Hargarten et al. 1993) ενώ παρεμβάσεις όπως η εργοθεραπεία, παρ' ότι δεν μεταβάλλουν την αιμοδυναμική κατάσταση, συχνά βελτιώνουν την απόδοση των ασθενών σε βαθμό παραπλήσιο με αυτόν των ενδαγγειακών επεμβάσεων επαναιμάτωσης (Hiatt, Regensteiner et al. 1990). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι υπάρχουν παράγοντες ανεξάρτητοι των αρτηριακών αποφράξεων, οι οποίοι έχουν σημαντική συμβολή στην κλινική παθοφυσιολογία της ΠΑΑ. Ο σημαντικότερος από αυτούς τους παράγοντες φαίνεται ότι σχετίζεται με παθολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων στο ισχαιμικό μέλος (Brass and Hiatt 2000). Στις επόμενες παραγράφους θα συνοψίσουμε τα τρέχοντα δεδομένα που δείχνουν ότι η ΠΑΑ σχετίζεται με μεταβολές στη δομή και τη σύνθεση των μιτοχονδρίων στους ισχαιμικούς σκελετικούς μυς. Τα στοιχεία αυτά αποτελέσαν την κατευθυντήρια αρχή για την εκπόνηση ενός

τριετούς διδακτορικού προγράμματος με κύριο στόχο τη διερεύνηση της λειτουργικής σημασίας αυτών των μιτοχονδριακών μεταβολών καθώς και της παθοβιολογίας τους.

Μιτοχονδριακές αλλοιώσεις σε σκελετικούς μυς ασθενών με Περιφερική Αποφρακτική Αρτηριοπάθεια (ΠΑΑ)

α. Δομικές αλλοιώσεις

Η μελέτη μιτοχονδρίων από χρονίως ισχαιμικό μυ, με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, δείχνει σημαντικές αλλοιώσεις στην υπερδομή. Τέτοιες αλλοιώσεις περιλαμβάνουν μιτοχονδριακή υπερπλασία, υπερτροφία και ανώμαλη διάταξη των μεμβρανικών πτυχών και ενδομιτοχονδριακά έγκλειστα. Όταν μελετήθηκαν μέλη με διαφορετικά επίπεδα ισχαιμίας βρέθηκε ότι τα μιτοχόνδρια με τις περισσότερες μεταβολές στην υπερδομή προέρχονταν από τα μέλη που είχαν και τον πιο προχωρημένο βαθμό ισχαιμίας (Farinon, Marbini et al. 1984; Marbini, Gemignani et al. 1986).

β. Διαφοροποιημένες ενζυματικές δραστηριότητες

Τα μιτοχόνδρια είναι ο κυτταρικός τόπος της οξειδωτικής παραγωγής ενέργειας και γι' αυτό έχουν σημαίνοντα ρόλο στη βιοενεργητική λειτουργία των μυών. Το περιεχόμενο των μυών σε μιτοχόνδρια μπορεί να εκτιμηθεί με τη μέτρηση της δραστηριότητας συγκεκριμένων μιτοχονδριακών ενζύμων που μένουν πολύ σταθερά ανά μονάδα μιτοχονδριακού όγκου (Holloszy 1967; Holloszy and Coyle 1984). Το μιτοχονδριακό περιεχόμενο των μυών είναι δυναμικό και αυξομειώνεται για να ανταποκριθεί στις μεταβολικές τους ανάγκες (Holloszy and Coyle 1984). Γι' αυτό η εργοθεραπεία σχετίζεται με αύξηση της περιεκτικότητας των μυών σε μιτοχόνδρια, ενώ η μειωμένη άσκηση ή καθιστική ζωή σχετίζονται με μείωση της μιτοχονδριακής περιεκτικότητας των μυών (Wibom, Hultman et al. 1992). Η ΠΑΑ οδηγεί σε περιορισμό της φυσικής δραστηριότητας και προοδευτικώς σε υποτονικό τρόπο ζωής. Αυτό το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας είναι ανάλογο με αυτό ατόμων που κάνουν καθιστική ζωή (Brass and Hiatt 2000), οπότε θα περίμενε κανείς η ΠΑΑ να σχετίζεται με μείωση της μιτοχονδριακής ενζυματικής δραστηριότητας/ περιεκτικότητας. Αντίθετα με αυτή την υπόθεση, μελέτες από διάφορα εργαστήρια έχουν δείξει μια αυξημένη μιτοχονδριακή περιεκτικότητα στους μυς ασθενών με ΠΑΑ (Bylund, Hammarsten et al. 1976; Jansson, Johansson et al. 1988;

Lundgren, Dahllof et al. 1989). Αυτή η αυξημένη μιτοχονδριακή έκφραση φαίνεται να είναι άμεσο και ανάλογο επακόλουθο της βαρύτητας της αποφρακτικής νόσου. Για παράδειγμα, αμφοτερόπλευρη βιοψία των γαστροκνημίων μυών από ασθενείς στους οποίους η αρτηριακή νόσος περιοριζόταν στο ένα μόνο κάτω μέλος, έδειξε αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα στο περισσότερο ισχαιμικό μέλος σε σχέση με το λιγότερο επηρεασμένο μέλος (Jansson, Johansson et al. 1988).

γ. Μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους DNA και αυτό κωδικοποιεί 13 πολυπεπτίδια που συμμετέχουν στη σύνθεση και λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Wallace 1992). Το μιτοχονδριακό DNA είναι ευπαθές στις βλάβες και σε διάφορες εκφυλιστικές παθήσεις συσσωρεύεται σε αυτό μια ποικιλία σημειακών (point) μεταλλάξεων και μεταλλάξεων έλλειψης (deletion) (Wallace 1992; Melon, Shoffner et al. 1995). Πρόσφατα δύο μελέτες έδειξαν ότι η ΠΑΑ σχετίζεται με σημαντική αύξηση στη συχνότητα της μετάλλαξης έλλειψης 4977bp στο μιτοχονδριακό DNA των χρονίως ισχαιμικών μυών (Bhat, Hiatt et al. 1999; Brass, Wang et al. 2000). Τα μιτοχονδριακά ένζυμα συντίθενται από πολλαπλά πρωτεϊνικά κομμάτια. Τα περισσότερα από αυτά, κωδικοποιούνται από πυρηνικό DNA και τα υπόλοιπα από μιτοχονδριακό DNA (Wallace 1992). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει συντονισμένη λειτουργία του πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Nagley 1991). Όμως, στην περίπτωση μιτοχονδριακών νόσων και ειδικά ανωμαλιών του μιτοχονδριακού DNA μπορεί να έχουμε σχετική αύξηση της πυρηνικής προς τη μιτοχονδριακή γονιδιακή έκφραση (Hoppel, Kerr et al. 1987). Η ΠΑΑ σχετίζεται με αυξημένη αναλογικώς δραστηριότητα της κιτρικής συνθετάσης (πυρηνική κωδικοποίηση) σε σχέση με αυτήν της κυτοχρωμικής οξειδάσης (μιτοχονδριακή κωδικοποίηση) (Bhat, Hiatt et al. 1999). Αυτή η διαφορετική έκφραση ενισχύει την άποψη αλλοιωμένου μιτοχονδριακού γονιδιώματος στην ΠΑΑ.

δ. Ενδείξεις αυξημένου οξειδωτικού στρες

Εργασίες σε έναν αριθμό πρότυπων συστημάτων, ειδικότερα την καρδιά, έχουν δείξει ότι τόσο η ισχαιμία όσο και η ισχαιμία-επαναιμάτωση, σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες εξαιτίας της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Karmazyn 1991; Turrens, Beconi et al. 1991). Επιπρόσθετα, η αθηροσκληρωτική διαδικασία αυτή καθ' αυτή αλλά και η ισχαιμία που προκαλεί, μπορούν να δημιουργήσουν οξειδωτικό στρες εξαιτίας της προκαλούμενης αυξημένης ενεργοποίησης των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων (Mehta, Nichols et al. 1988).

Διάφοροι ερευνητές έχουν προσεγγίσει με ποικίλους τρόπους και έχουν περιγράψει το οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με ΠΑΑ (Hickman, Harrison et al. 1994; Belch, Mackay et al. 1995). Η μαλονδιαλδεύδη είναι προϊόν (και δείκτης) λιπιδικής υπεροξείδωσης από επίδραση ελευθέρων ριζών. Οι συγκεντρώσεις της μαλονδιαλδεύδης είναι σημαντικά αυξημένες στην ΠΑΑ και αυξάνονται ακόμη περισσότερο μετά την άσκηση (Hickman, Harrison et al. 1994; Belch, Mackay et al. 1995). Επιπλέον, έλεγχος με χρώση μπλε νίτρο-τετραζολίου των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων σε ασθενείς με τη νόσο δείχνει ότι αυτά είναι ενεργοποιημένα (Neumann, Waas et al. 1990), παρέχοντας μια επιπρόσθετη πηγή συστηματικού οξειδωτικού στρες.

Το αυξημένο οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει πολύπλευρη μεταβολική σημασία. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το σημαντικότερο τόπο παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οποιαδήποτε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, και ειδικά ανωμαλίες στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, μεγεθύνουν την ηλεκτροχημική τάση στις μιτοχονδριακές μεμβράνες και μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή και διαρροή ελευθέρων ριζών σε παθολογικά επίπεδα (Ames, Shigenaga et al. 1993). Επομένως, το οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στην ΠΑΑ μπορεί να είναι ένας επιπλέον αντικατοπτρισμός της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Εναλλακτικά, τα μιτοχόνδρια είναι ένας σημαντικός στόχος της βλάβης που προκαλείται από ελεύθερες ρίζες (Ames, Shigenaga et al. 1993). Εργασία σε πρότυπα μοντέλα κατέδειξε ότι η έκθεση σε ελεύθερες ρίζες μπορεί να οδηγήσει σε απευθείας οξειδωτική βλάβη κρίσιμων πρωτεϊνών, κάτι που είναι δυνατό να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια της απόδοσης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Davies 1987; Davies and Delsignore 1987).

Οι μελέτες που αναφέραμε δείχνουν στοιχεία παθολογικών μεταβολών σε ένα σημαντικό αριθμό μιτοχονδριακών συστατικών. Το κατά πόσο οι μεταβολές αυτές σχετίζονται με βελτιωμένη ή επιδεινωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία δεν έχει ερευνηθεί. Η πρώτη μελέτη μας σχεδιάστηκε ειδικά για να αξιολογήσει τη λειτουργική σημασία αυτών των μιτοχονδριακών αλλοιώσεων, στο ευρύτερο πλαίσιο της βιοενεργητικής λειτουργίας του σκελετικού μυός.

Ανασκόπηση δομής και λειτουργίας των μιτοχονδρίων (Γεώργιος Θωμόπουλος, διαδικτυακός τόπος μοριακής βιολογίας 1999)

α. Γενικά

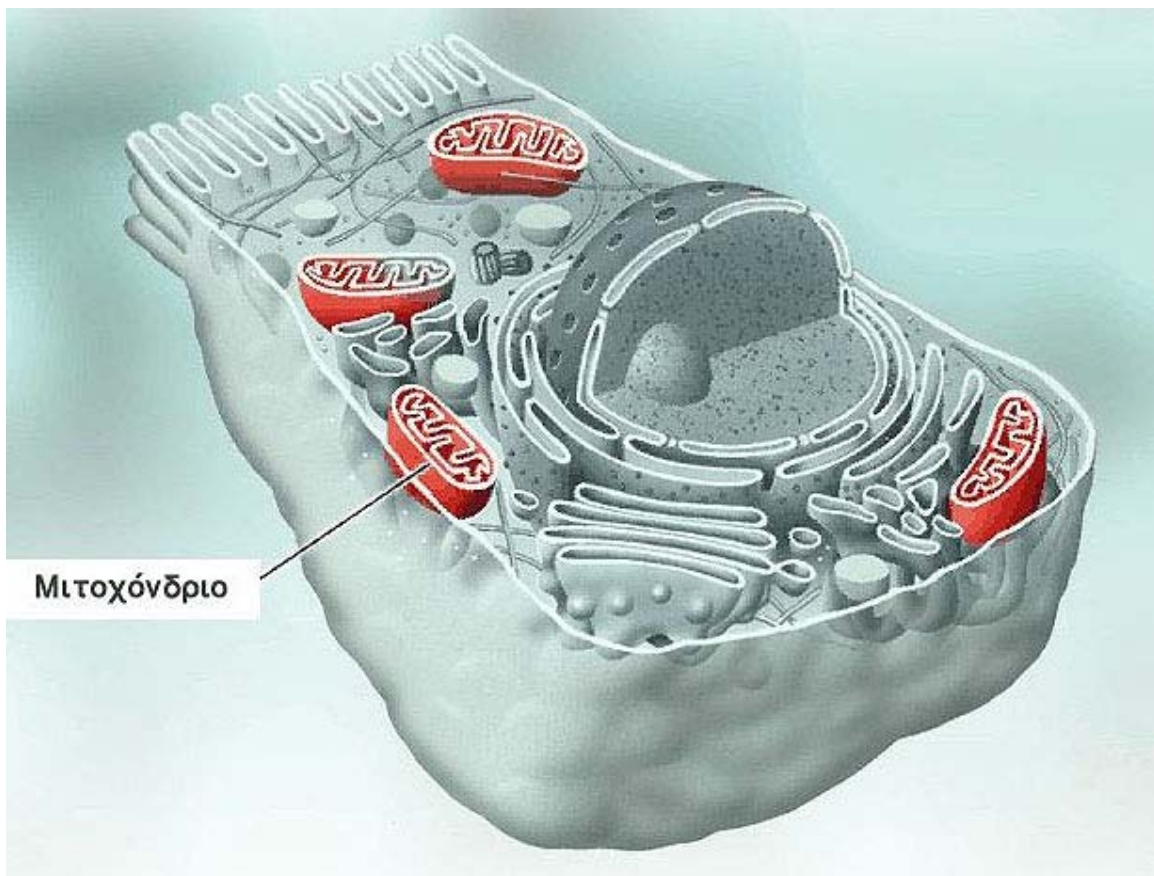
Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το σπουδαιότερο παραγωγό αδενοσινωτριφοσφορικού (ATP) των κυττάρων. Η σύνθεση της ATP από τα μιτοχόνδρια πραγματοποιείται από κυτταρικά “καύσιμα” (κυρίως υδατάνθρακες, λιπίδια και πρωτεΐνες) τα οποία οξειδώνονται και μέσα από μια σειρά πολύπλοκων αντιδράσεων παράγουν ATP.

β. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των Μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια που βρίσκονται σ' όλους σχεδόν τους οργανισμούς και θεωρούνται ως τα "ενεργειακά κέντρα" του κυττάρου (**Εικόνα 1**). Η μορφή των μιτοχονδρίων διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων. Τα μιτοχόνδρια είναι συνήθως ωοειδή ή κυλινδρικά, με πλάτος 0,2μm και μήκος μέχρι και 7μm, ενώ υπάρχουν και σφαιρικά μιτοχόνδρια με διάμετρο 0,5 - 5 μm.

Το μέγεθος αλλά και το σχήμα των μιτοχονδρίων μπορεί να μεταβληθεί κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ή μετά την επίδραση διαφόρων ουσιών. Πολύ μεγάλα μιτοχόνδρια, τα οποία ονομάζονται μεγαμιτοχόνδρια και έχουν μήκος μέχρι και 30 μm, παρατηρούνται σε περιπτώσεις αλκοολισμού και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Στο μυοκάρδιο, π.χ. κάτω από συνθήκες ανοξίας, υποξίας ή μετά την επίδραση ορμονών ή φαρμάκων σχηματίζονται μεγαμιτοχόνδρια. Μεγαμιτοχόνδρια παρατηρούνται και σε περιπτώσεις έλλειψης ριβοφλαβίνης ή χαλκού, με αποτέλεσμα ο μιτοχονδριακός όγκος να αυξάνεται τουλάχιστον 10 φορές σε σχέση με τα κανονικά μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια, όπως έχει παρατηρηθεί σε ζωντανά κύτταρα, εμφανίζουν παθητικές και ενεργητικές κινήσεις και παρουσιάζουν αλλαγές στον όγκο και το σχήμα. Οι αλλαγές αυτές έχουν σχέση με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, τα οποία είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε αλλαγές διαφόρων μεταβολικών παραγόντων, όπως π.χ. οξυγόνου, νερού, ιόντων, θερμοκρασίας, pH, κτλ. Έτσι, μεταβολές στην ένταση της μιτοχονδριακής αναπνοής, της φωσφορυλίωσης, της πρόσληψης ιόντων και νερού διακρίνονται αμέσως στη λεπτή δομή των μιτοχονδρίων.

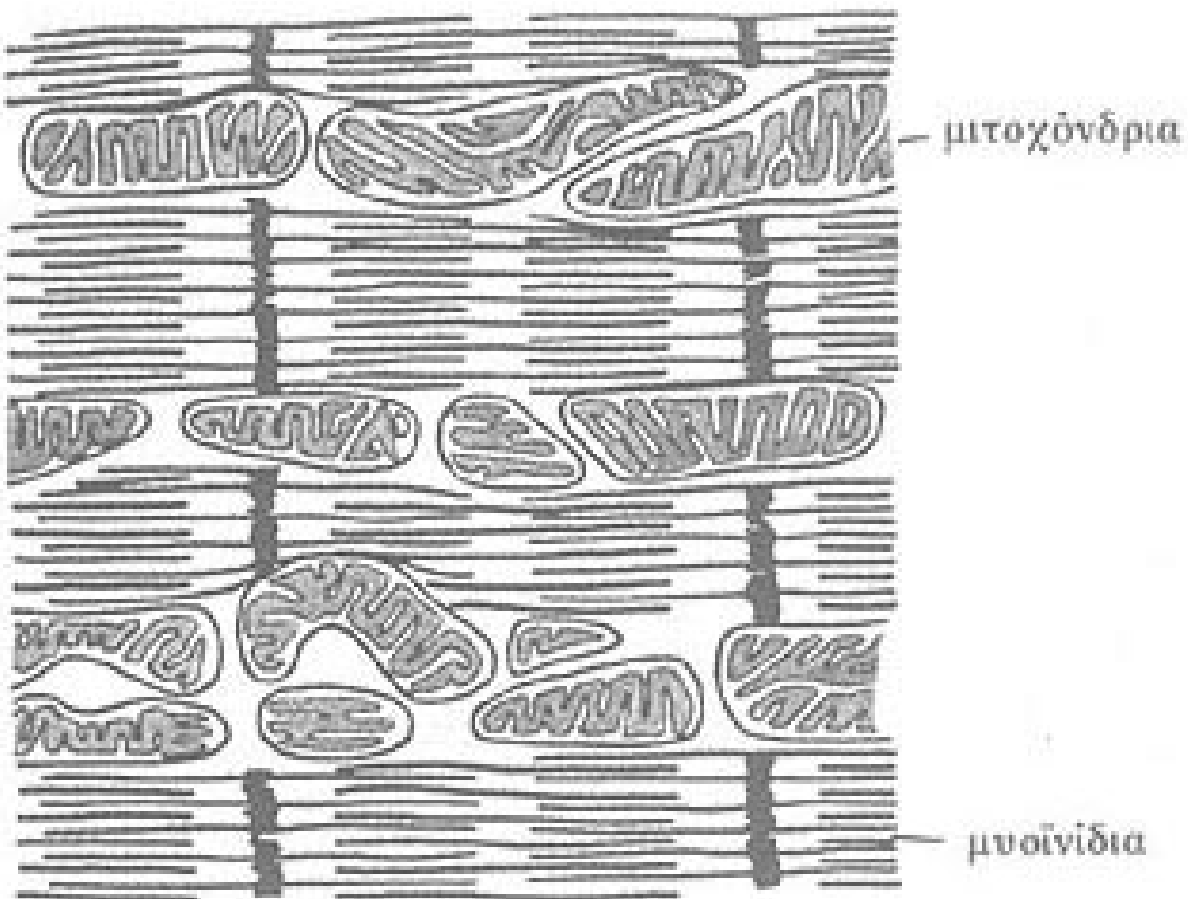
Εικόνα 1: Οι δραστηριότητες της ζωής απαιτούν τη συνεχή παροχή ενέργειας. Στο κυτταρικό επίπεδο η απαιτούμενη ενέργεια παρέχεται με τη μορφή ATP. Η ATP σχηματίζεται στο κυτταρόπλασμα (γλυκόλυση) καθώς επίσης στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Τα μιτοχόνδρια, που βρίσκονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, αποτελούν το σπουδαιότερο παραγωγό ATP (Από τον διαδικτυακό τόπο Μοριακής βιολογίας του καθηγητή Γεώργιου Θωμόπουλου).



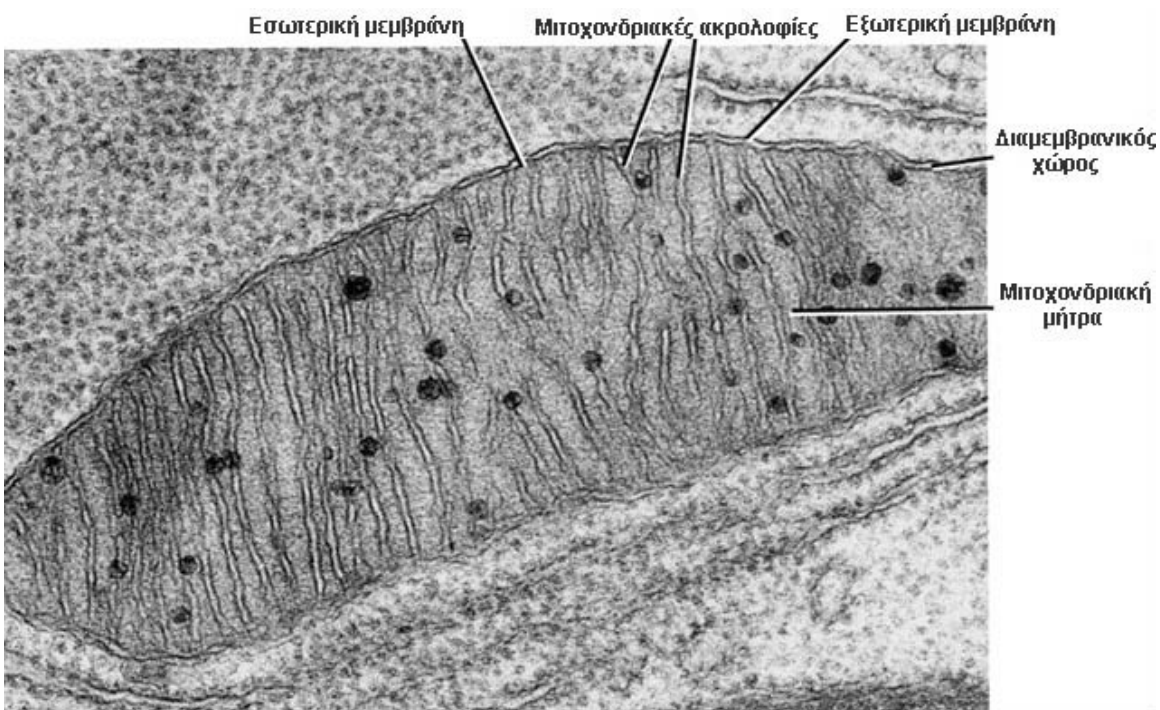
γ. Δομή και χημική σύσταση των μιτοχονδρίων (Εικόνα 3)

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια με διπλή μεμβράνη. Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη έχει πάχος 7 nm και διαχωρίζει το μιτοχόνδριο από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα, ενώ η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη έχει πάχος 5 nm και σχηματίζει πολύπλοκες αναδιπλώσεις προς το εσωτερικό του μιτοχονδρίου οι οποίες ονομάζονται μιτοχονδριακές ακρολοφίες. Οι μιτοχονδριακές ακρολοφίες είναι ατελή διαφράγματα τα οποία δε διακόπτουν τη συνέχεια του εσωτερικού χώρου. Ο αριθμός των μιτοχονδριακών ακρολοφιών εξαρτάται από την απαιτούμενη παραγωγή ενέργειας στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Στα κύτταρα των σκελετικών μυών (**Εικόνα 2**) υπάρχουν πολλά μιτοχόνδρια που έχουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδριακών ακρολοφιών, ενώ αντίθετα στα καρκινικά κύτταρα (τα οποία συχνά, για την απόκτηση της ενέργειας που χρειάζονται, χρησιμοποιούν κυρίως τη γλυκόλυση) τα μιτοχόνδρια έχουν λίγες μιτοχονδριακές ακρολοφίες. Ο χώρος μεταξύ των δύο μιτοχονδριακών μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος, ενώ ο χώρος που περικλείεται από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ονομάζεται μιτοχονδριακή μήτρα. Μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα βρίσκονται τα ενδομιτοχονδριακά κοκκία (τα οποία αποτελούν θέσεις δέσμευσης δισθενών ιόντων, κυρίως Ca^{+2} και Mg^{+2}) και τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα. Στα μιτοχόνδρια υπάρχει κυκλικό μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), το οποίο συνήθως προσκολλάται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη σ' ένα ή δύο σημεία. Στις μιτοχονδριακές ακρολοφίες υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός σωματιδίων, τα οποία μπορούν να παρατηρηθούν μόνο μετά από θραύση των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Τα σωματίδια αυτά ονομάζονται στοιχειώδη σωματίδια και αντιπροσωπεύουν μια ειδική ATPάση, την $\text{FoF}_1\text{ATPάση}$, (σύμπλεγμα V) η οποία συμμετέχει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση συνθέτοντας ATP. Έχει αποδειχθεί ότι σε κάθε μιτοχόνδριο υπάρχουν 104 - 105 στοιχειώδη σωματίδια και πιστεύεται ότι υπάρχει στενή σχέση ανάμεσα στον αριθμό των μιτοχονδριακών ακρολοφιών και σωματίων και την οξειδωτική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων.

Εικόνα 2: Οι σκελετικοί μυς περιέχουν πολύ μεγάλους αριθμούς μιτοχονδρίων που βρίσκονται πάντοτε πολύ κοντά στη συσταλτή περιοχή του μυοϊνιδίου, διευκολύνοντας την παροχή ενέργειας για τη μυϊκή συστολή (Από το διαδικτυακό τόπο Μοριακής βιολογίας του καθηγητή Γεώργιου Θωμόπουλου).



Εικόνα 3. Δομή των μιτοχονδρίων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Από το διαδικτυακό τόπο Μοριακής βιολογίας του καθηγητή Γεώργιου Θωμόπουλου).



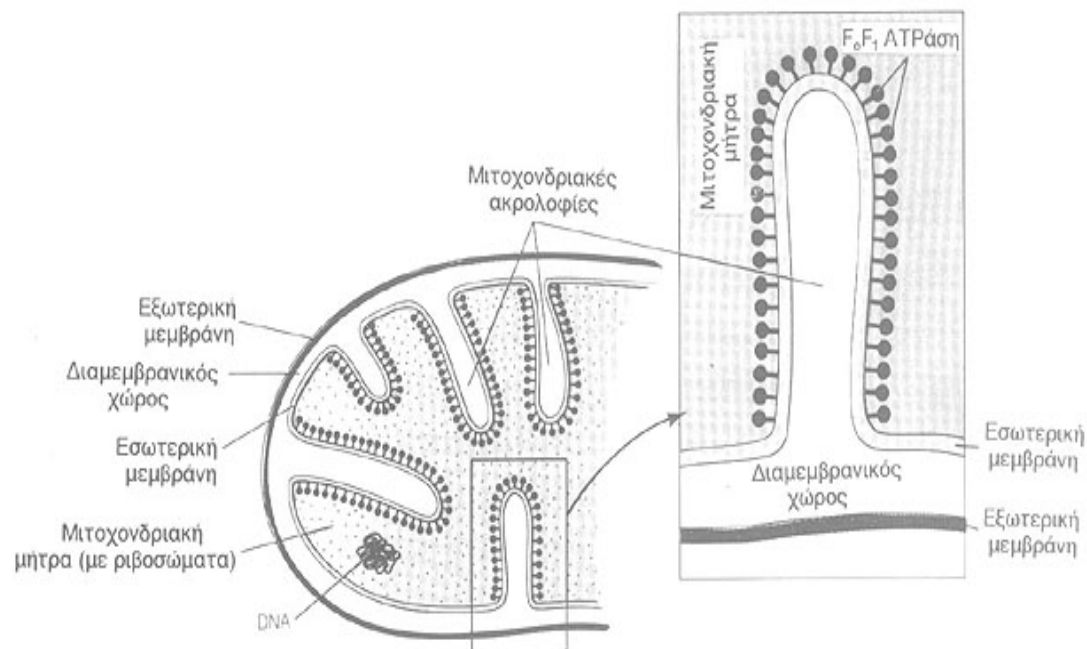
δ. Εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη

Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη περιέχει 25% φωσφολιπίδια και το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών (75%) από κάθε άλλη κυτταρική μεμβράνη. Επίσης είναι πλούσια σε καρδιολιπίνη (δι-φωσφατιδυλική γλυκερόλη), έναν ιδιαίτερο τύπο φωσφολιπιδίου που πιστεύεται ότι μειώνει τη διαπερατότητα της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας. Στην εσωτερική μεμβράνη βρίσκονται όλα τα συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα συστατικά αυτά αντιπροσωπεύουν το 35% των μιτοχονδριακών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επιπλέον, στην εσωτερική μεμβράνη απαντώνται αρκετοί ειδικοί μεταφορείς που παίρνουν μέρος στη μεταφορά μεταβολιτών. Ο αριθμός και ο τύπος των μεταφορέων ποικίλλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, τα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων χρειάζονται μεγαλύτερη ποικιλία μεταφορέων διότι συμμετέχουν στις αρχικές αντιδράσεις αρκετών αναβολικών δρόμων, σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια των μυϊκών κύτταρων, τα οποία είναι αφοσιωμένα στη σύνθεση ATP που απαιτείται για τη μυϊκή λειτουργία.

Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αναδιπλώνεται προς το εσωτερικό του μιτοχονδρίου σχηματίζοντας τις μιτοχονδριακές ακρολοφίες (**Εικόνα 4**). Οι μιτοχονδριακές ακρολοφίες αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό την επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, συμβάλλοντας με αυτόν το τρόπο στην ικανότητά της για μεγαλύτερη παραγωγή ATP.

Τα μιτοχόνδρια των καρδιακών και σκελετικών μυών περιέχουν τουλάχιστον τρεις φορές περισσότερες μιτοχονδριακές ακρολοφίες σε σχέση με ένα τυπικό μιτοχόνδριο ενός ηπατοκυττάρου. Ο μεγαλύτερος αριθμός μιτοχονδριακών ακρολοφιών αντανάκλα τις μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση μιτοχονδριακών ακρολοφιών έχει βρεθεί στα μιτοχόνδρια πτητικών μυών εντόμων. Στο άλλο άκρο βρίσκονται τα μιτοχόνδρια νευραξόνων στον εγκέφαλο κουνελιού τα οποία περιέχουν μία μόνο μιτοχονδριακή ακρολοφία σε κάθε μιτοχόνδριο.

Εικόνα 4: Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αναδιπλώνεται προς το εσωτερικό του μιτοχονδρίου σχηματίζοντας τις μιτοχονδριακές ακρολοφίες. Οι μιτοχονδριακές ακρολοφίες αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό την επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην ικανότητά της για μεγαλύτερη παραγωγή ATP. Το πιο ευδιάκριτο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της μεμβράνης είναι η αντλία H^+ -ATPάση που συνθέτει ATP, η οποία επίσης ονομάζεται F_0F_1 ATPάση ή σύμπλεγμα V (Από το διαδικτυακό τόπο Μοριακής βιολογίας του καθηγητή Γεώργιου Θωμόπουλου).



ε. Μιτοχονδριακή μήτρα

Η μιτοχονδριακή μήτρα περιέχει τα διαλυτά ένζυμα και τα ενδιάμεσα προϊόντα της οξειδωσης του πυροσταφυλικού και του κύκλου του κιτρικού οξέος, καθώς και DNA, RNA, μιτοχονδριακά ριβοσώματα και άλλα συστατικά της μιτοχονδριακής πρωτεϊνικής σύνθεσης. Μόνο ένα ένζυμο του κύκλου του κιτρικού οξέος (το ένζυμο που καταλύει την οξείδωση του ηλεκτρικού οξέος) είναι στενά συνδεδεμένο με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το ένζυμο αυτό, μαζί με τον αποδέκτη ηλεκτρονίων της αντίδρασης, FAD, συναποτελούν τμήμα του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας.

Στη μιτοχονδριακή μήτρα και στην εσωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης έχει επίσης αποδειχτεί η ύπαρξη ακτίνης, η παρουσία της οποίας πιστεύεται ότι συμβάλλει στην παραγωγή κάποιου μηχανικού έργου απαραίτητου για τις δομικές αλλαγές που παρατηρούνται στα μιτοχόνδρια.

ζ. Οξειδωτική φωσφορυλίωση-Παραγωγή ATP (Εικόνα 5)

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση μπορεί να χωριστεί σε τρία λειτουργικά στάδια, τα οποία είναι κοινά σε όλους τους οργανισμούς που παράγουν ATP με το μηχανισμό αυτό:

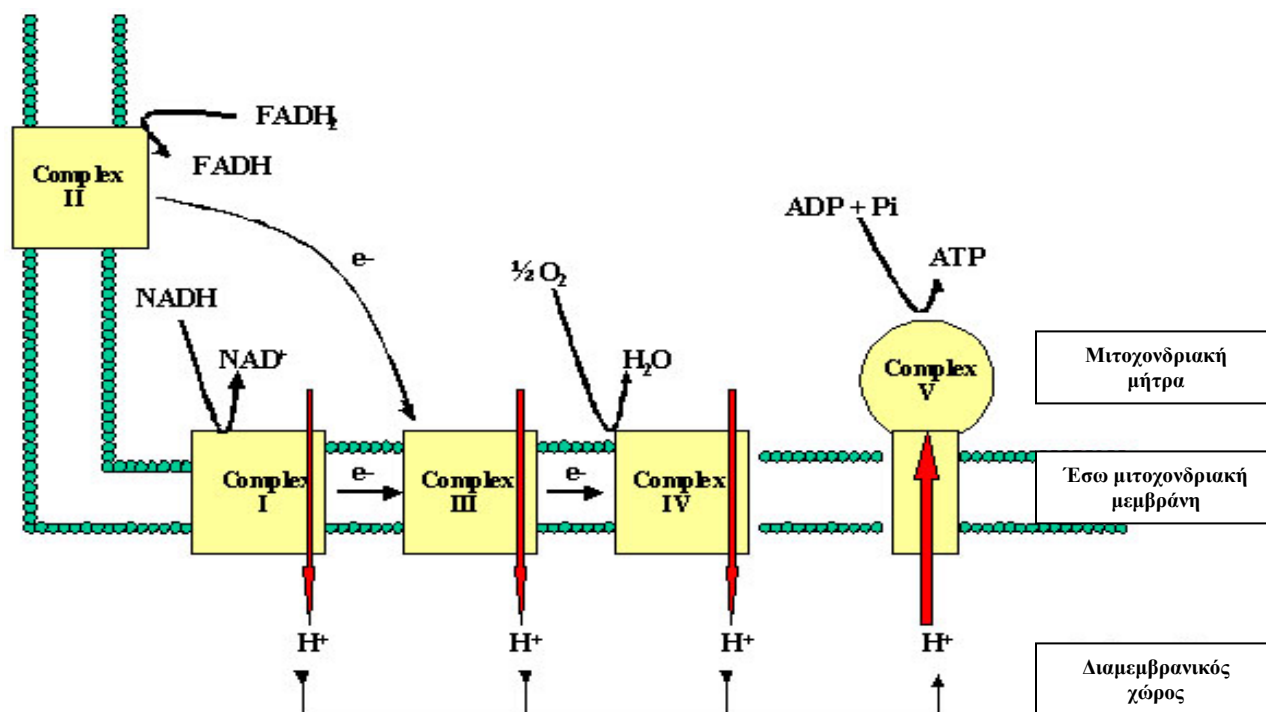
ζ1) παραγωγή ηλεκτρονίων υψηλού επιπέδου ενέργειας: Οι κυτταρικές οξειδώσεις, κατά τις οποίες αποβάλλονται ηλεκτρόνια από τα οργανικά μόρια που χρησιμοποιούνται ως “καύσιμα”, αποτελούν την άμεση πηγή παραγωγής των ηλεκτρονίων υψηλού επιπέδου ενέργειας. Αν και όλες οι ομάδες των βιολογικών μορίων (υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες ή πυρηνικά οξέα) μπορούν να οξειδωθούν και να αποδώσουν ηλεκτρόνια, τα κύρια “καύσιμα” που χρησιμοποιούνται από τα περισσότερα κύτταρα είναι τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες. Μετά την αποβολή τους από τα μόρια αυτά, τα ηλεκτρόνια μεταβιβάζονται στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι οξειδωτικές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στο διαλυτό κυτταρόπλασμα των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων.

ζ2) σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων: Το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων χρησιμοποιεί την ενέργεια των παραγόμενων ηλεκτρονίων για να δημιουργήσει μια βαθμίδωση H^+ κατά μήκος της μεμβράνης στην οποία βρίσκεται το σύστημα αυτό. Το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων

αποτελείται από μια σειρά μορίων-μεταφορέων που βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Κάθε μεταφορέας ηλεκτρονίων δέχεται και απελευθερώνει ηλεκτρόνια, έτσι ώστε τα ηλεκτρόνια που μεταβιβάζονται στον επόμενο μεταφορέα να έχουν χαμηλότερη ενέργεια. Η ενέργεια που χάνεται από τα ηλεκτρόνια, καθώς περνούν από τον ένα μεταφορέα στον άλλον, απελευθερώνεται ως ελεύθερη ενέργεια, δηλ. ενέργεια η οποία δεν παράγει έργο. Ένα ποσοστό της ενέργειας χρησιμοποιείται από τους μεταφορείς για τη μετακίνηση H^+ από το ένα μέρος της εσωτερικής μεμβράνης στο άλλο, ενάντια στην ηλεκτροχημική τους βαθμίδωση. Η μετακίνηση αυτή δημιουργεί και διατηρεί τη βαθμίδωση H^+ που απαιτείται για τη σύνθεση της ATP. Ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων στο σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι το O_2 . Το οξυγόνο καθώς δέχεται τα ηλεκτρόνια συνδέεται με υδρογόνο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία H_2O στο τελευταίο στάδιο της μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Οι μεταφορείς ηλεκτρονίων είναι εσωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκα με μη πρωτεϊνικές οργανικές ομάδες (συμπλέγματα I, II, III, IV). Η οργανική ομάδα, η οποία σε πολλές περιπτώσεις περιέχει και ένα μεταλλικό ιόν, είναι μέρος του μεταφορέα ηλεκτρονίων.

ζ3) ενζυμικό σύστημα παραγωγής ATP: Το ενζυμικό σύστημα παραγωγής ATP χρησιμοποιεί τη βαθμίδωση H^+ ως ενεργειακή πηγή για τη φωσφορυλίωση της ADP σε ATP. Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση τόσο το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων όσο και οι αντλίες που μεταφέρουν H^+ (H^+ -ATPάση, σύμπλεγμα V) βρίσκονται στην ίδια μεμβράνη. Η αντλία H^+ -ATPάση που συνθέτει ATP ονομάζεται F_0F_1 ATPάση. Ο μηχανισμός που συνδέει τη βαθμίδωση H^+ με τη σύνθεση ATP προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Mitchell το 1961, και αναφέρεται ως χημειοσμωτική υπόθεση. Η φυσιολογική οξειδωτική φωσφορυλίωση παρατίθεται περιληπτικά στην **Εικόνα 5**.

Εικόνα 5. Φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης: Τα NADH και FADH_2 ,που σχηματίζονται στις αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων, είναι μόρια πλούσια σε ενέργεια επειδή περιέχουν ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με μεγάλο ενεργειακό δυναμικό μεταφοράς. Τα ηλεκτρόνια αυτά μεταφέρονται κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω τεσσάρων διαδοχικών συμπλεγμάτων (complexes I έως IV). Οξυγόνο καταναλίσκεται σαν τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα την παραγωγή νερού. Τα συμπλέγματα I, III και IV χρησιμοποιούν την ενέργεια των ηλεκτρονίων και αντλούν πρωτόνια από το εσωτερικό του μιτοχονδρίου στο διαμεμβρανικό χώρο. Έτσι η συγκέντρωση των πρωτονίων γίνεται μεγαλύτερη στο διαμεμβρανικό χώρο, δημιουργώντας ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό (ηλεκτρική και χημική βαθμίδωση εκατέρωθεν της εσωτερικής μεμβράνης). Τα πρωτόνια μπορούν να επιστρέψουν στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου μόνο δια του συμπλέγματος V (ATP συνθάση). Το σύμπλεγμα V χρησιμοποιεί αυτή την εξώεργη ροή των πρωτονίων για να ωθήσει την ενδόεργη αντίδραση σχηματισμού ATP.



Ανασκόπηση του βιοενεργητικού μεταβολισμού των μυών

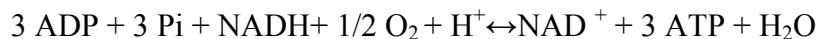
Η ενεργειακή κατάσταση του μυός είναι αποτέλεσμα ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής και της κατανάλωσης ATP. Το ATP είναι μια πλούσια ενεργειακά ένωση που παρέχει την ενέργεια για τη συστολή μυών μέσω της αποφωσφορυλίωσής του, προς σχηματισμό ADP και ανόργανου φωσφορικού (Pi): $ATP \leftrightarrow ADP + Pi + \text{ενέργεια}$

Κατά τη διάρκεια της άσκησης ενεργοποιούνται τρεις διαφορετικές ενεργειακές οδοί, οι οποίες βρισκόμενες σε συνεχή συνδυασμό και αλληλοσυμπλήρωση εξασφαλίζουν αδιάκοπη παραγωγή ATP. Συγκεκριμένα, κατά την έναρξη της άσκησης τη σημαντικότερη πηγή ανασύνθεσης ATP αποτελεί η αντίδραση διάσπασης της PCr μέσω της οδού της κινάσης της κρεατίνης (CK), γνωστής επίσης ως "άμεσο" σύστημα παραγωγής ATP: $PCr + ADP + H^+ \leftrightarrow Cr + ATP$

Εντός δευτερολέπτων μετά την έναρξη της άσκησης, ένα συνεχώς αυξανόμενο ποσοστό ATP παράγεται από αναερόβια γλυκόλυση (AnGly). Η γλυκόλυση είναι "το βραχυπρόθεσμο" σύστημα παραγωγής ATP του κυττάρου:



Αυτοί οι δύο μεταβολικοί δρόμοι καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των απαιτήσεων του μυός σε ATP στα πρώτα λεπτά της άσκησης, μέχρις ότου η "μακροπρόθεσμη" οξειδωτική φωσφορυλίωση (OxPhos) να ενεργοποιηθεί σταδιακά και να γίνει ο κυρίαρχος προμηθευτής ATP κατά τη διάρκεια της άσκησης:



Με τη διακοπή της άσκησης και οι δύο μεταβολικοί δρόμοι (CK και AnGly) απενεργοποιούνται αμέσως. Στη συνέχεια, τα επίπεδα της διασπασθείσας φωσφοκρεατίνης, αποκαθίστανται μέσω της οδού της κινάσης της κρεατίνης με τη χρήση ATP, το οποίο με τη σειρά του παράγεται εξ ολοκλήρου μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ταυτόχρονα, τα επίπεδα του ADP που είχαν αυξηθεί κατά τη διάρκεια της άσκησης από την αποφωσφορυλίωση του ATP, επανέρχονται στα χαμηλά τους επίπεδα ηρεμίας, καθώς η οξειδωτική φωσφορυλίωση μετατρέπει το ADP σε ATP. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια

και επομένως ο ρυθμός αποκατάστασης της PCr και του ADP μετά από μυϊκή άσκηση είναι άριστος δείκτης της μιτοχονδριακής λειτουργίας (Chance 1984; Argov and Bank 1991; Boska 1994).

Γ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΩΤΗ ΜΕΛΕΤΗ: Η Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού καταδεικνύει παθολογική μιτοχονδριακή λειτουργία στους χωλαίνοντες μυς ασθενών με αρτηριακή αποφρακτική νόσο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

Πριν από τέσσερα περίπου έτη ξεκινήσαμε μία σειρά μελετών με σκοπό να ερευνήσουμε την υπόθεση ότι υπάρχει μία πρωτογενής μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στους χωλαίνοντες μυς ασθενών με ΠΑΑ (Pipinos, Shepard et al., 2000). Οι πρόσφατες πρόοδοι στη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού φωσφόρου ή ³¹P *Magnetic Resonance Spectroscopy* (MRS) επέτρεψαν την έρευνα της βιοενεργητικής κατάστασης των χωλαινόντων μυών μη επεμβατικά και in vivo (Chance 1984; Argon and Bank 1991). Με τη μέθοδο της MRS μπορούν να μετρηθούν οι συγκεντρώσεις του ATP (αδενοσινοτριφωσφορικού), ADP (αδενοσινοδιφωσφορικού), PCr (φωσφοκρεατίνης) και του ενδοκυττάριου pH με χρονική ανάλυση της τάξης του ενός δευτερολέπτου. Οι μετρήσεις γίνονται στο μυ πριν, κατά τη διάρκεια και μετά από άσκηση, και με στοιχειομετρική ανάλυση μπορούν να καθορίσουν τους ρυθμούς με τους οποίους πραγματοποιούνται οι φωσφοενεργειακές αντιδράσεις (Argon and Bank 1991; Boska 1994). Τα μιτοχόνδρια είναι τα βασικότερα οργανίδια του κυτταρικού ενεργειακού μεταβολισμού και κατά συνέπεια μπορούν απευθείας να μελετηθούν με μελέτες MRS υψηλής ανάλυσης. Γι' αυτό και αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε την MRS στη μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας των μυών, σε ασθενείς με ΠΑΑ και διαλείπουσα χωλότητα. Η υπόθεσή μας ήταν ότι υπάρχει μια πρωτογενής μιτοχονδριακή ανωμαλία στο χωλαίνοντα σκελετικό μυ.

ΜΕΘΟΔΟΙ 1^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

Μελετήθηκαν 12 ασθενείς με ΠΑΑ και ήπια προς μέτρια διαλείπουσα χωλότητα. Επιπλέον, 14 μη πάσχοντα άτομα απασχολούμενα σε καθιστικές εργασίες αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Όλοι οι ασθενείς ήταν μη διαβητικοί, με δείκτη πίεσεων σφυρών (ABI) $\leq 0,8$ αλλά $\geq 0,5$. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής του νοσοκομείου και οι ασθενείς υπέγραψαν ειδικά έντυπα συγκατάθεσης για τη συμμετοχή τους στην έρευνα.

Έλεγχος με MRS

Η βιοενεργητική κατάσταση των μυών της γαστροκνημίας μετρήθηκε στην ηρεμία, κατά τη διάρκεια, και μετά από άσκηση (90 sec ισομετρικής πελματικής κάμψης). Όλοι οι ασθενείς με ΠΑΑ υποβλήθηκαν σε MRS αξιολογήσεις των μυών της γαστροκνημίας στο μέλος με το χαμηλότερο ABI. Όλα τα μη πάσχοντα άτομα της ομάδας ελέγχου υποβλήθηκαν σε MRS αξιολογήσεις των μυών της γαστροκνημίας του δεξιού κάτω μέλους τους. Όλοι οι συμμετέχοντες στην μελέτη ήταν νήστες και απέχχαν από την καφεΐνη για τουλάχιστον 6 ώρες πριν τη μελέτη.

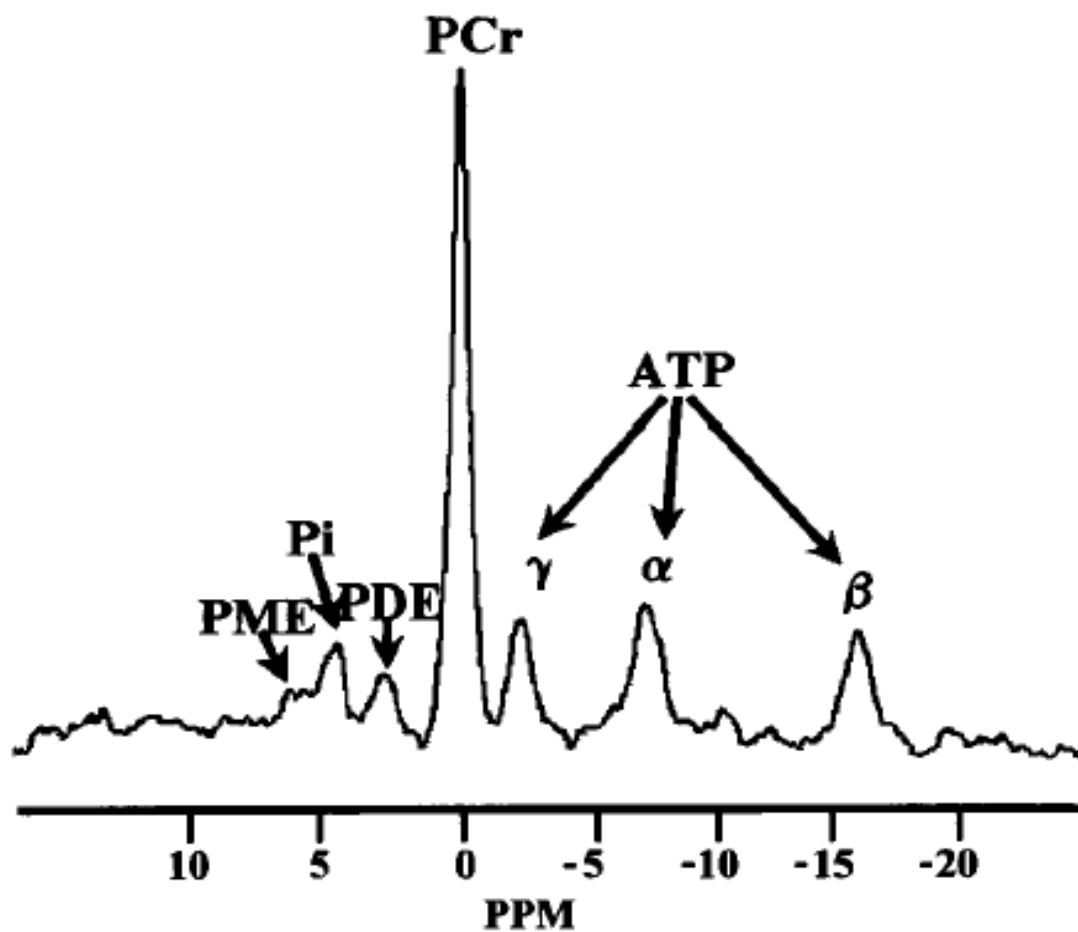
Περιγραφή συσκευής και πρωτοκόλλου άσκησης MRS

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ολόσωμο μαγνήτη έντασης 3 Τέσλα (Magnex Scientific) με τη βοήθεια ειδικής κονσόλας εικονοληψίας και ανάλυσης (Surrey Medical imaging Systems, Surrey, UK). Η άσκηση που χρησιμοποιήσαμε έχει περιγραφεί στο παρελθόν λεπτομερώς (Boska 1994; Boska, Nelson et al. 1999). Συγκεκριμένα, το υπό μελέτη μέλος τοποθετήθηκε σε μία ειδική εργομετρική διάταξη που κατασκευάσαμε μόνοι στο εργαστήριο μας. Η διάταξη αποτελείται από ένα ανοιχτό ισομετρικό εργόμετρο συνδεδεμένο με μετατροπέα-αναλυτή δυνάμεων (Tedea # 1250, 300 kg; Tedea Huntleigh, Inc, Canoga Park, Calif). Για την καταγραφή των φασματοσκοπικών δεδομένων χρησιμοποιήσαμε ένα επαγωγικό σύρμα διπλής επιφάνειας διαμέτρου 9 cm, συντονισμένου στη μαγνητική συχνότητα αντήχησης των ατόμων φωσφόρου (51,7 Mhz at 3,0 T). Τα κάτω άκρα των ασθενών τοποθετήθηκαν στη συσκευή με το γόνατο σε έκταση, με το επαγωγικό σύρμα εφαρμοσμένο χαλαρά πάνω στο οπίσθιο διαμέρισμα των μυών της γαστροκνημίας, και με το πόδι τους δεμένο στο πεντάλ του ευθύγραμμου εργομέτρου. Εν συνεχεία, ζητήθηκε από τους ασθενείς να ωθήσουν ενάντια στο πεντάλ για να ασκήσουν ισομετρικά τους μυς του οπισθίου διαμερίσματος (καμπτήρες ποδιών). Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε απεικονίσεις της γαστροκνημίας που πάρθηκαν με κλασσική μαγνητική τομογραφία πρωτονίων, ώστε να υπολογισθεί το μέγιστο εμβαδόν διατομής του γαστροκνημίου και πελματιαίου μυός. Από το εμβαδόν αυτό υπολογίστηκε η θεωρητική ικανότητα παραγωγής δυνάμεων αυτής της μυϊκής ομάδας, με βάση δεδομένα από φυσιολογικούς ανθρώπους (Boska 1994). Στη συνέχεια, οι ασθενείς τοποθέτησαν το πόδι τους σε πελματιαία κάμψη με στόχο την άσκηση δύναμης της τάξης του $60 \pm 15\%$ (μέσες τιμές $\pm$ σταθερό σφάλμα) της υπολογιζόμενης

μέγιστης ικανότητας των κνημιαίων μυών τους. Οι ασθενείς πραγματοποίησαν συνολικά τρεις ισομετρικές ασκήσεις πελματιαίας κάμψης. Κάθε μία από τις ασκήσεις διήρκησε 90 δευτερόλεπτα, με διαλείμματα ξεκούρασης διάρκειας 15 λεπτών μεταξύ των ασκήσεων. Τα φάσματα των φωσφορούχων ενώσεων καταγράφηκαν με ρυθμό ένα φάσμα ανά δευτερόλεπτο, πριν, κατά τη διάρκεια, και μετά το τέλος κάθε άσκησης.

Η βραχεία ισομετρική άσκηση των καμπτήρων των ποδιών που εκτελέστηκε κατά τη διάρκεια της MRS επιλέχθηκε σκόπιμα αντί της μακρύτερης ισοτονικής άσκησης του κάτω άκρου, η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά την αξιολόγηση με κυλιόμενο τάπητα, επειδή η ισομετρική άσκηση: (1) μπορεί να εκτελεστεί ενώ ο ασθενής βρίσκεται εντός του μαγνητικού πεδίου, (2) μπορεί να απομονωθεί σε μία μόνο ομάδα μυών και (3) είναι εξαιρετικά ήπια και προφανώς πολύ χαμηλή σε απαιτήσεις οξυγόνωσης μυών, τέτοιες που δεν υπερβαίνουν την ικανότητα αιματικής παροχής του πάσχοντος αρτηριακού δέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η άμεση μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας με ταυτόχρονη αποφυγή οποιασδήποτε σύγχυσης λόγω των επιδράσεων πιθανής μυϊκής ισχαιμίας. Παράλληλα, η δυνατότητα εξέτασης της βιοενεργητικής κατάστασης των μυών υπό συνθήκες φυσιολογικής παροχής οξυγόνου επιτρέπει την άμεση μελέτη της ενδογενούς μιτοχονδριακής αποδοτικότητας.

Εικόνα 6. Χαρακτηριστικό *in vivo* φάσμα φωσφόρου των μυών της γαστροκνημίας από ασθενή με μέτρια διαλείπουσα χολόληθα.



Ανάλυση φασμάτων MRS

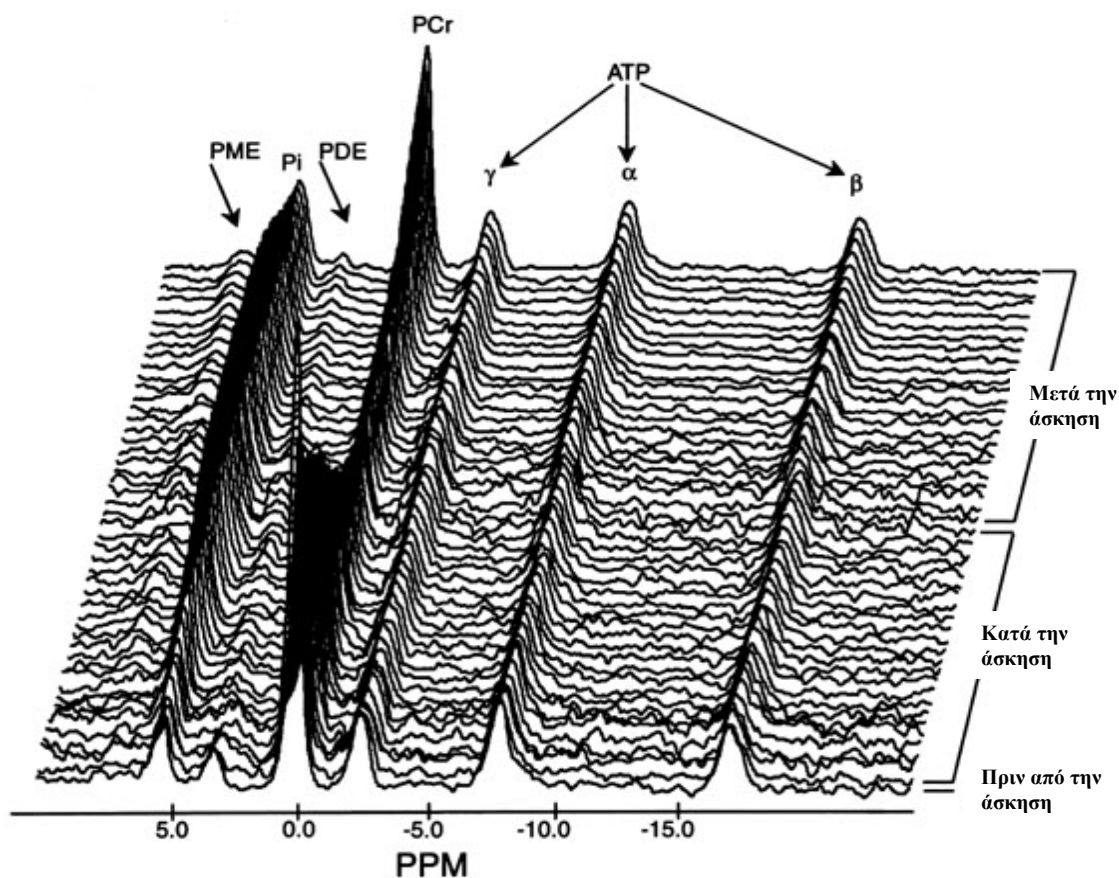
Η **εικόνα 6** απεικονίζει ένα χαρακτηριστικό *in vivo* φάσμα MRS των οπίσθιων μυών της κνήμης, όπως αυτό λαμβάνεται με τον ασθενή σε ηρεμία. Το άτομο φωσφόρου έχει περιττό αριθμό νετρονίων και πρωτονίων στον πυρήνα του και είναι επομένως ανιχνεύσιμο με τις τεχνικές μαγνητικής αντήχησης. Ο φώσφορος είναι το κεντρικό στοιχείο του φωσφορικού άλατος, το οποίο με τη σειρά του είναι βασικό συστατικό πολλών σημαντικών βιομορίων. Οι φωσφορούχοι πυρήνες του DNA, RNA, των περισσότερων φωσfolιπιδίων και των φωσφοπρωτεϊνών είναι ακίνητοι και δεν παράγουν εύκολα μετρήσιμο σήμα στο μαγνητικό πεδίο. Τα ATP (αδενοσινοτριφωσφορικό), ADP (αδενοσινοδιφωσφορικό), PCr (φωσφοκρεατίνη) και Pi (ανόργανος φωσφόρος) είναι οι κύριες κινητές ενώσεις πλούσιες σε φώσφορο και ταυτόχρονα παρούσες σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις στον ιστό, ώστε να παράγουν ακριβές, εύκολα μετρήσιμο φασματοσκοπικό σήμα. Καθένα από τα τρία άτομα φωσφορικού άλατος του ATP έχει διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις και ευκρινώς διαφορετικές φασματικές αιχμές. Στο φάσμα MRS η πιο εξέχουσα αιχμή είναι της PCr, η οποία βρίσκεται ακριβώς αριστερά αυτής του γ-ATP. Τα φάσματα των δύο φωσφορικών αλάτων του ADP δε μπορούν να απεικονισθούν επειδή οι φυσικές συγκεντρώσεις τους στο κύτταρο είναι πολύ χαμηλές (500-1000 φορές χαμηλότερες από εκείνες του ATP) και έτσι οι αιχμές από τις φωσφορούχες ομάδες τους καλύπτονται πίσω από αυτές του ATP. Οι συγκεντρώσεις του ADP μπορούν εντούτοις να υπολογισθούν εύκολα από το pH και τις συγκεντρώσεις των ATP, PCr και της ελεύθερης κρεατίνης. Οι τρεις χαμηλότερες αιχμές αριστερά αυτής της PCr είναι των φωσφοδιεστέρων (PDE), του Pi και των φωσφομονοεστέρων (PME). Η αιχμή του Pi είναι ιδιαίτερα σημαντική επειδή αντιπροσωπεύει το ποσό των ορατών μόνο- και δι- βασικών ανόργανων φωσφορικών αλάτων. Αυτές οι δύο μορφές φωσφορικού άλατος συμμετέχουν στο ρυθμιστικό ενδοκυτταρικό σύστημα φωσφορικών αλάτων και μετατρέπονται με γρήγορους ρυθμούς η μία στην άλλη, ανάλογα με το pH του κυττάρου. Η χημική μετατόπιση της αιχμής του Pi προκύπτει από τον μέσο όρο αυτών των δύο μορφών φωσφορικού άλατος. Οι αλλαγές στο pH μεταβάλλουν την ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο μορφών και παράγουν έτσι μια αλλαγή στη χημική μετατόπιση της αιχμής του Pi. Η ενδοκυτταρική οξέωση μετατοπίζει την αιχμή πιο κοντά, ενώ η αλκάλωση πιο μακριά από την αιχμή PCr. Αυτές οι μετατοπίσεις της αιχμής Pi, σε σχέση με τη σταθερή

θέση της αιχμής PCr, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πολύ ευαίσθητη *in vivo* μέτρηση του ενδοκυτταρικού pH (Moon and Richards 1973; Arnold, Matthews et al. 1984).

Η **εικόνα 7** απεικονίζει μια σύνοψη γραφημάτων από φάσματα φωσφορούχων ενώσεων, όπως μετρήθηκαν από το γαστροκνήμιο και πελματιαίο μυ ασθενούς με μέτρια διαλείπουσα χωλότητα. Κατά τη διάρκεια της μυϊκής άσκησης τα επίπεδα PCr σταδιακά μειώνονται ενώ του ανόργανου φωσφορικού (Pi) αυξάνονται. Με τη λήξη της άσκησης οι δυο ενώσεις επανέρχονται βαθμιαία στα αρχικά τους επίπεδα. Τα επίπεδα ATP παραμένουν αμετάβλητα κατά τη διάρκεια της άσκησης. Η διατήρηση σταθερών επιπέδων ATP είναι κρίσιμης σπουδαιότητας στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Οι συγκεντρώσεις του ATP ελαττώνονται μόνο κάτω από ακραίες συνθήκες (π.χ., βαριά και εκτεταμένη ισχαιμία ή οξεία κυτταρική βλάβη).

Από τα παραπάνω φάσματα μπορούν να ληφθούν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου. Χρησιμοποιώντας τις βιοενεργητικές στοιχειομετρικές εξισώσεις, μπορούμε εύκολα να υπολογίσουμε τις σχετικές συνεισφορές των τριών κύριων μεταβολικών δρόμων (οδού της κινάσης της κρεατίνης (CK), αναερόβιας γλυκόλυσης (AnGly) και οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OxPhos) στην παραγωγή ATP κατά τη διάρκεια και μετά την ολοκλήρωση της άσκησης. Επίσης, το ενδοκυττάριο pH χρησιμοποιείται ως δείκτης για την παρουσία αναερόβιου μεταβολισμού. Τέλος, η λειτουργική κατάσταση των μιτοχονδρίων των μυϊκών κυττάρων μπορεί να καθοριστεί με ακρίβεια με τη μέτρηση των σταθερών του ρυθμού αποκατάστασης (recovery rate constants) της PCr και του ADP μετά από τη μυϊκή άσκηση. Οι ρυθμοί ανάκαμψης των δύο αυτών ενώσεων είναι απόλυτα εξαρτημένοι από τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση και επομένως συναποτελούν μία πολύ ευαίσθητη μέτρηση της μιτοχονδριακής αποδοτικότητας. Συγκεκριμένα, απλές εκθετικές προσομοιώσεις για την αποκατάσταση των PCr και ADP μπορούν να υπολογισθούν, και από αυτές τις καμπύλες μπορούν να υπολογισθούν εν συνεχεία οι ρυθμοί ανάκαμψης των PCr και ADP. Οι σταθερές ρυθμού ανάνηψης αυτών των ενώσεων αντανakλούν άμεσα τη μιτοχονδριακή οξειδωτική δραστηριότητα και υπολογίζονται έπειτα ως τα αντίστροφα ($1/PCr$ και $1/ADP$) των χρόνων ανάνηψης των PCr και ADP.

Εικόνα 7. Στην εικόνα απεικονίζεται μια σύνοψη γραφημάτων από φάσματα φωσφορούχων ενώσεων όπως αυτά μετρήθηκαν από τους κνημιαίους καμπήρες μυς ασθενούς με μέτρια διαλείπουσα χωλότητα. Η άσκηση σχεδιάστηκε να είναι πολύ χαμηλής έντασης, έτσι ώστε οι απαιτήσεις των μυών της κνήμης σε οξυγόνο να μην υπερβαίνουν την ικανότητα του πάσχοντος αρτηριακού δένδρου για αιματική παροχή. Επιτρέπεται, με αυτόν τον τρόπο άμεση μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας και αποφεύγεται σύγχυση από τις επιδράσεις πιθανής μυϊκής ισχαιμίας. Όπως εξηγούμε εκτενώς στο κείμενο, κατά τη διάρκεια της μυϊκής άσκησης τα επίπεδα PCr σταδιακά μειώνονται, ενώ του ανόργανου φωσφορικού (Pi) αυξάνονται. Με τη λήξη της άσκησης οι δύο ενώσεις επιστρέφουν βαθμιαία στα αρχικά τους επίπεδα. Τα επίπεδα ATP παραμένουν αμετάβλητα κατά τη διάρκεια αυτής της άσκησης χαμηλής έντασης. Το ADP βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα κύτταρα των μυών και οι αιχμές από τις φωσφορούχες του ομάδες καλύπτονται πίσω από αυτές του ATP. Αν και δε διακρίνεται εύκολα σε αυτή τη γραφική παράσταση, κατά τη διάρκεια της άσκησης η αιχμή του Pi μεταναστεύει σε σχέση με τη σταθερή θέση της αιχμής της PCr και αυτή η σχετική μετατόπιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πολύ ευαίσθητο *in vivo* μέτρο του ενδοκυτταρικού pH. Η λειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να καθοριστεί με τη μέτρηση των σταθερών του ρυθμού αποκατάστασης της PCr και του ADP. Οι σταθερές αυτές εξαρτώνται εξ ολοκλήρου από τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση και έτσι αποτελούν ένα πολύ ακριβές και ευαίσθητο μέτρο της μιτοχονδριακής λειτουργίας. PME =φωσφομονοεστέρες, PDE = φωσφοδιεστέρες.



Δοκιμασία κόπωσης σε κεκλιμένο κυλιόμενο δάπεδο

Οι ασθενείς με ΠΑΑ περπάτησαν σε κεκλιμένο κυλιόμενο δάπεδο (12,5 μοίρες), με ταχύτητα 2,5 km/h, και για διάρκεια 5 λεπτών (ή λιγότερο εάν ο πόνος τους ανάγκαζε να σταματήσουν). Για τον υπολογισμό των δεικτών πίεσης των σφυρών (ABI) χρησιμοποιήθηκε τυποποιημένη τεχνική. Πιο συγκεκριμένα, η συστολική πίεση (της ραχιαίας του ποδός και της οπίσθιας κνημιαίας αρτηρίας) μετρήθηκε με τη χρήση κατάλληλου αεροθαλάμου μανομέτρου και φορητής συσκευής Doppler. Για κάθε μέλος, η αναλογία του υψηλότερου των δύο πιέσεων των σφυρών προς την υψηλότερη των δύο βραχιόνιων πιέσεων, υπολογίστηκε ως ο αρχικός ABI. Η ίδια σφυραία και βραχιόνια αρτηρία χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των ABI μετά την δοκιμασία σε κυλιόμενο δάπεδο. Η δοκιμασία κόπωσης σε κεκλιμένο κυλιόμενο δάπεδο προκαλεί τις μέγιστες απαιτήσεις ροής στο πιο συμπτωματικό μέλος. Οι παράμετροί της συσχετίζονται καλά με τις μετρήσεις ροής αίματος στην κνήμη και γενικά είναι μια ιδιαίτερα ακριβής και εύκολα διαθέσιμη μέθοδος για την εκτίμηση της αιμοδυναμικής βαρύτητας της αρτηριακής νόσου (Wolf, Sumner et al. 1972). Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν περιέλαβαν: (α) τους αρχικούς ABIs (β) τους ABIs ένα λεπτό μετά την άσκηση, (γ) τη μέγιστη πτώση των ABIs και (δ) το χρόνο που απαιτείται για να επανέλθουν οι ABIs στις αρχικές τους τιμές.

Αποστάσεις χωλότητας

Μετά την ολοκλήρωση της αρχικής δοκιμασίας σε κυλιόμενο τάπητα και μια περίοδο ανάπαυσης 30 λεπτών, οι ασθενείς περπάτησαν πάλι στον κυλιόμενο τάπητα. Αυτή τη φορά μετρήσαμε την αρχική απόσταση που μπορούσαν να διανύσουν χωρίς να αισθάνονται πόνο (αρχική απόσταση προ εμφάνισης χωλότητας) καθώς και τη μέγιστη απόσταση που μπορούσαν να βαδίσουν παρά τα πιθανά συμπτώματα πόνου (μέγιστη απόσταση χωλότητας). Συνεπώς, η αρχική απόσταση προ εμφάνισης χωλότητας είναι η απόσταση που ο ασθενής μπορεί να περπατήσει κάτω από τις ανωτέρω καθορισμένες συνθήκες μέχρι να αισθανθεί πόνο. Η μέγιστη απόσταση χωλότητας είναι η μέγιστη απόσταση που μπορεί να διανύσει ο ασθενής μέχρι ο πόνος στο χωλαίνον μέλος να τον αναγκάσει να σταματήσει. Τέσσερις επιλεγμένοι ασθενείς υποβλήθηκαν επίσης στις μετρήσεις ABI στο πιο πάσχον μέλος, πριν και 1 λεπτό μετά από την εκτέλεση μιας ισομετρικής άσκησης πελματικής κάμψης 90 δευτερολέπτων. Η άσκηση συγκεκριμένα περιελάμβανε στάση στα δάχτυλα των ποδιών και απομάκρυνση των πτερνών από

το έδαφος για 90 δευτερόλεπτα. Σαν σκοπό είχε να μιμηθεί την άσκηση που εκτέλεσαν οι ασθενείς εντός του μαγνητικού πεδίου, ώστε να καταδειχθεί εάν η συγκεκριμένη άσκηση μετέβαλε την αρτηριακή ροή στους ασθενείς που μελετήσαμε.

Στατιστική ανάλυση

Οι παράμετροι MRS από την ομάδα ελέγχου και τους ασθενείς με ΠΑΑ συγκρίθηκαν με τη βοήθεια t-test. Οι συσχετισμοί μεταξύ των στοιχείων που προέκυψαν από τη δοκιμασία κόπωσης σε κεκλιμένο κυλινόμενο δάπεδο και το MRS στους ασθενείς με ΠΑΑ επεξεργάστηκαν με τη χρησιμοποίηση του συσχετισμού PEARSON. Τιμή $P < 0,05$ θεωρήθηκε ενδεικτική σημαντικής διαφοράς. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ σταθερό σφάλμα, εκτός αν ορίζονται διαφορετικά. Για τη στατιστική ανάλυση και παραγωγή γραφικών παραστάσεων χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά Sigmastat (SPSS, INC, Chicago, Ill) και Sigmaplot (Jandel) αντίστοιχα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

Μετρήσεις με MRS (Πίνακας 1)

Όλοι οι ασθενείς με ΠΑΑ και οι φυσιολογικοί ασθενείς ελέγχου ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο άσκησης MRS χωρίς να παρουσιάσουν οποιαδήποτε συμπτώματα χωλότητας. Όπως αναμενόταν, κατά τη διάρκεια της άσκησης, η PCr μειώθηκε και τα Pi και ADP αυξήθηκαν, ενώ τα επίπεδα του ATP παρέμειναν σταθερά. Δεν υπήρξε καμία σημαντική διαφορά στη σχετική αλλαγή συγκέντρωσης οποιουδήποτε από αυτούς τους μεταβολίτες φωσφόρου μεταξύ της ομάδας ασθενών με αρτηριακή νόσο και της ομάδας ελέγχου.

Ο **πίνακας 1** δείχνει το ενδοκυττάριο pH μετά το τέλος της άσκησης στην ομάδα με ΠΑΑ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στους ασθενείς με χωλότητα η τιμή του pH του μυϊκού κυττάρου στο τέλος της άσκησης παρέμεινε εντός των φυσιολογικών ορίων ($7,11 \pm 0,01$) και ήταν ίδια με αυτή που μετρήθηκε σε κύτταρα φυσιολογικών ατόμων ($7,11 \pm 0,01$). Η σύγκριση του μηχανισμού ενεργοποίησης αναερόβιας γλυκόλυσης κατά τη διάρκεια της άσκησης στους

ασθενείς με χωλότητα και στην ομάδα ελέγχου παρουσιάζεται επίσης στον **πίνακα 1**. Συγκεκριμένα, στο χωλαίνοντα μυ, η παραγωγή ATP από AnGly παρέμεινε μέσα στα φυσιολογικά όρια και ήταν ουσιαστικά η ίδια όπως στο φυσιολογικό μυ ($0,14 \pm 0,01$ σε σχέση με $0,13 \pm 0,01$ mmol / L ανά δευτερόλεπτο). Το ATP που καταναλώθηκε κατά τη διάρκεια της άσκησης αναπαρήχθη με τη χρήση ουσιαστικά του ίδιου συνδυασμού και των ίδιων αναλογιών των οδών OxPhos, AnGly και CK τόσο στο χωλαίνοντα όσο και στο φυσιολογικό μυ (**πίνακας 1**).

Η σταθερά ρυθμού ανάνηψης των τιμών της PCr ήταν σημαντικά μικρότερη στο μυ με χωλότητα από ότι στον κανονικό μυ ($0,012 \pm 0,003$ σε σχέση με $0,030 \pm 0,002$ s⁻¹). Επίσης, η σταθερά ρυθμού ανάνηψης του ADP ήταν σημαντικά μικρότερη στο μυ με χωλότητα από ότι στον κανονικό μυ ($0,018 \pm 0,005$ σε σχέση με $0,036 \pm 0,002$ s⁻¹). Κατά τρόπο ενδιαφέροντα εντούτοις, δεν έδειξαν όλοι οι ασθενείς με ΠΑΑ τέτοια καθυστερημένη αποκατάσταση των PCr και ADP. Τρεις εκ των 12 ασθενών (ποσοστό 25%) είχαν μιτοχονδριακούς δείκτες (σταθερά PCr $0,024 \pm 0,002$ s⁻¹ και σταθερά ADP $0,037 \pm 0,02$ s⁻¹) που ενέπιπταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Σε αυτήν την περίπτωση, τα φυσιολογικά όρια ορίστηκαν ως ο μέσος όρος ± 2 σταθερές απόκλισης της αντίστοιχης τιμής στην ομάδα ελέγχου (δηλ., για την PCr σταθερά ρυθμού ανάνηψης φυσιολογικά όρια είναι $0,015 - 0,045$ s⁻¹ και για την ADP σταθερά ρυθμού ανάνηψης $= 0,024 - 0,048$ s⁻¹).

Πίνακας 1. Παράμετροι MRS σε ασθενείς με ΠΑΑ και ήπια προς μέτρια διαλείπουσα χολότητα (n=12) και σε φυσιολογικά, μη πάσχοντα άτομα απασχολούμενα σε καθιστικές εργασίες (n=14): Pi = ανόργανος φωσφόρος, ADP = αδενοσινοδιφωσφορικό, AnGly = αναερόβια γλυκόλυση, CK = οδός κρεατινικής κινάσης, OxPhos = οξειδωτική φωσφορυλίωση.

	Ασθενείς με χολότητα (n=12)	Φυσιολογικοί (n=14)	Τιμή P
<u>Επίπεδα στο τέλος της άσκησης</u>			
PCr (mM)	18,9±1,3	17,4±0,7	0,3
Pi (mM)	11,6±1,1	11,3±0,6	0,8
ADP (μM)	41±6	42±5	0,9
PH	7,11±0,01	7,11±0,01	0,9
<u>Μεταβολισμός κατά την άσκηση</u>			
An Gly (mM/s)	0,14±0,01	0,13±0,01	0,92
CK (mM/s)	0,07±0,01	0,06±0,01	0,6
Ox Phos (mM/s)	0,12±0,02	0,13±0,01	0,71
<u>Ανάνηψη</u>			
PCr σταθερά ρυθμού ανάνηψης (s ⁻¹)*	0,012±0,003	0,030±0,002	0,02
ADP σταθερά ρυθμού ανάνηψης (s ⁻¹)*	0,018±0,005	0,036±0,002	0,002

Η μόνη αξιοπρόσεκτη, αν και όχι στατιστικώς σημαντική ($P > 0,05$), διαφορά μεταξύ της ομάδας των ασθενών με χωλότητα με τη "φυσιολογική" μιτοχονδριακή λειτουργία και της ομάδας των ασθενών με "ανώμαλη" λειτουργία, ήταν η διάρκεια των κλινικών συμπτωμάτων χωλότητας. Στην υποομάδα με τις φυσιολογικές μιτοχονδριακές παραμέτρους, τα συμπτώματα χωλότητας ήταν παρόντα κατά μέσο όρο για $1,3 \pm 0,3$ έτη. Στην υποομάδα με τις "ανώμαλες" μιτοχονδριακές παραμέτρους τα συμπτώματα ήταν παρόντα κατά μέσο όρο για $4,4 \pm 1,6$ έτη.

Μετρήσεις με κυλιόμενο τάπητα

Η αξιολόγηση των μετρήσεων με κυλιόμενο τάπητα έγινε μόνο στους ασθενείς με ΠΑΑ. Οι ασθενείς αυτοί είχαν σε ηρεμία έναν μέσο ABI $=0,65 \pm 0,03$ (μεταξύ 0,5-0,8). Ο ABI ένα λεπτό μετά από την άσκηση μειώθηκε σε $0,3 \pm 0,05$, δηλαδή παρατηρήθηκε μια μέγιστη μείωση της τάξης του $56\% \pm 7\%$. Οι ABIs μετά από την άσκηση επανήλθαν στις αρχικές τιμές κατά μέσο όρο μετά από 13 ± 3 λεπτά. Η αρχική απόσταση προ εμφάνισης χωλότητας ήταν 98 ± 32 μέτρα και η μέγιστη απόσταση χωλότητας ήταν 354 ± 64 μέτρα. Δεν υπήρξε κανένας στατιστικά σημαντικός συσχετισμός μεταξύ οποιωνδήποτε εκ των παραμέτρων της δοκιμασίας κυλιόμενου τάπητα (οι οποίες αντικατοπτρίζουν πρώτιστα το βαθμό της αρτηριακής απόφραξης) και οποιωνδήποτε εκ των παραμέτρων MRS (οι οποίες αντικατοπτρίζουν πρώτιστα την τελική μεταβολική λειτουργία των οργάνων). Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα με τις χειρότερες παραμέτρους στον κυλιόμενο τάπητα δεν είχαν απαραίτητως τους χειρότερους MRS δείκτες μιτοχονδριακής λειτουργίας. Για τους τέσσερις ασθενείς με ΠΑΑ που εκτέλεσαν την 90 δευτερολέπτων άσκηση ανασήκωσης στα δάχτυλα των ποδιών τους, ο ABI του ασκούμενου μέλους σε ανάπαυση ήταν ίσος με $0,675 \pm 0,05$ (μεταξύ 0,6-0,8) και σε 1 λεπτό μεταβλήθηκε ελάχιστα και ήταν ίσος με $0,65 \pm 0,1$ ($P > 0,05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 1^η ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο στόχος της πρώτης μας μελέτης ήταν να εξεταστεί η υπόθεση ότι υπάρχει μια παθολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων σε ασθενείς με περιφερική ΠΑΑ. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε σχεδιάστηκε για να εξετάσει την βιοενεργητική κατάσταση των σκελετικών μυών υπό συνθήκες ελάχιστα διαταραγμένης ροής αίματος, επιτρέποντας την άμεση μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας χωρίς τις συγγένουσες επιδράσεις της ισχαιμίας. Χρησιμοποιήσαμε

τη μεθοδολογία MRS και σχεδιάσαμε μια μελέτη που επιτρέπει την εκτίμηση του ασθενούς, ενώ αυτός βρίσκεται εντός του μαγνητικού πεδίου και με μια αρκετά ήπια άσκηση, έτσι ώστε η απαίτηση των μυών για οξυγόνο να μην υπερβαίνει την προσφορά του. Για να παραχθεί μια πληρέστερη και ακριβής εικόνα της βιοχημικής λειτουργίας των μυών χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τροποποιήσεις (Hands, Bore et al. 1986; Zatina, Berkowitz et al. 1986; Williams, Fencil et al. 1990; Kemp, Thompson et al. 1993; Wahl, Simon et al. 1994). Αυτές περιέλαβαν (1) εργομετρική διάταξη που απομονώνει την άσκηση σε μια μόνο μυϊκή ομάδα, (2) εργομετρική τυποποίηση του πρωτοκόλλου άσκησης, (3) χρήση ισομετρικής άσκησης για να ελαχιστοποιηθούν τα τεχνικά σφάλματα (artifacts) εξ αιτίας της κίνησης μέσα στο μαγνητικό πεδίο, (4) συμμετοχή μη-διαβητικών ασθενών, για να αποκλεισθεί πιθανή επιρροή του παθολογικού μεταβολισμού γλυκόζης στις μετρήσεις της ενεργειακής κατάστασης των μυών και (5) πραγματοποίηση φασματοσκοπίας με την υψηλότερη δυνατή χρονική ανάλυση.

Τα φάσματα άσκησης κατέδειξαν ότι το ATP που καταναλώθηκε κατά τη διάρκεια της άσκησης τόσο στο χωλαίνοντα όσο και στο φυσιολογικό μυ, παρήχθη μέσω της ενεργοποίησης του ίδιου συνδυασμού των οδών OxPhos, AnGly και CK. Καμία πρόσθετη ενεργοποίηση των αναερόβιων οδών δεν παρατηρήθηκε στους ασθενείς με ΠΑΑ σε σύγκριση με τους υγιείς της ομάδας ελέγχου. Στο τέλος της άσκησης, το ενδοκυττάριο pH και οι συγκεντρώσεις των ATP, ADP, PCr και Pi δεν διέφεραν μεταξύ χωλαινόντων και υγιών μυών. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η άσκηση MRS δε μείωσε σημαντικά την παροχή οξυγόνου στους ασκούμενους μυς στην ομάδα ασθενών με αρτηριακή νόσο. Η απουσία πτώσης στα ABIs των 4 ασθενών που εξετάστηκαν, μετά από την πραγματοποίηση της πελματικής άσκησης κάμψεων 90 δευτερολέπτων, ισχυροποιεί ακόμα περισσότερο την υπόθεσή μας ότι η βραχείας διάρκειας, ήπια ισομετρική άσκηση δεν απαιτήσε περισσότερη ροή αίματος από αυτή που μπορεί να παρασχεθεί από το αρτηριακό δένδρο των ασθενών με ήπια προς μέτρια χωλότητα. Τόσο οι ασθενείς με ΠΑΑ, όσο και οι φυσιολογικοί, είχαν συγκρίσιμη παραγωγή και κατανάλωση ATP κατά τη διάρκεια της άσκησης. Όλοι οι ασθενείς, επομένως, με τη λήξη της άσκησης είχαν παρόμοιο ενεργειακό χρέος που έπρεπε να αποκατασταθεί μέσω της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά τη διάρκεια της φάσης αποκατάστασης, οι σταθερές χρόνου αποκατάστασης των PCr και ADP ήταν σημαντικά πιο χαμηλές στην ομάδα των ασθενών με

ΠΑΑ από ότι στους φυσιολογικούς. Αυτά τα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει σημαντική μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στους χωλαίνοντες μυς.

Το γεγονός ότι το 25% των ασθενών με χωλότητα είχε "φυσιολογικούς" μιτοχονδριακούς δείκτες λειτουργίας, είναι ενδεικτικό ότι η αιτία αυτής της δυσλειτουργίας είναι πολύπλοκη και πολυπαραγοντική και δε μπορεί να αποδοθεί απλώς στην παρουσία αποφρακτικής νόσου στο αρτηριακό δέντρο που αιματώνει το υπό μελέτη μέλος. Στην παθολογία των μιτοχονδρίων φαίνεται να υπεισέρχεται ένας συνδυασμός παραγόντων που σχετίζονται με το μέγεθος της «ισχαιμικής προσβολής» στην οποία εκτίθεται ο χωλαίνων μυς. Πιο συγκεκριμένα, πιθανοί τέτοιοι παράγοντες είναι το επίπεδο της αποφρακτικής νόσου (π.χ., αορτολαγόνιος έναντι μηροϊγνυακής), η διάρκεια των συμπτωμάτων χωλότητας, τα επίπεδα καθημερινής άσκησης, η παρουσία, η δριμύτητα και η διάρκεια των σχετικών συνοδών νόσων (π.χ., κάπνισμα, διαβήτης, υπέρταση, δυσλιπιδαιμίες, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια) καθώς και η διατροφική κατάσταση των ασθενών. Όταν αναλύσαμε τα χαρακτηριστικά αυτών των ασθενών, η μόνη αξιοπρόσεχτη διαφορά που επισημάνθηκε ήταν μια σχετικά πιο σύντομη διάρκεια των συμπτωμάτων χωλότητας στην υποομάδα των ασθενών με χωλότητα και "κανονική" μιτοχονδριακή λειτουργία. Αυτό το εύρημα, αν και δεν είναι στατιστικά σημαντικό, μάλλον δείχνει μια πιθανή συσσωρευτική βλάβη των μιτοχονδρίων του χωλαίνοντος μυός, ως αποτέλεσμα των επαναλαμβανόμενων επεισοδίων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης που αυτός υφίσταται κάθε φορά που ο ασθενής βαδίζει. Επιπλέον, το γεγονός ότι κλινικά η σοβαρότητα της αρτηριακής αποφρακτικής βλάβης δεν αντιστοιχεί απαραίτητα με τη βαρύτητα της ισχαιμικής προσβολής που παράγει, μπορεί να είναι ο λόγος για τον οποίο οι παράμετροι που μετρήθηκαν με κυλιόμενο τάπητα δε συσχετίζονται με τους δείκτες μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η δοκιμασία κόπωσης σε κεκλιμένο κυλιόμενο δάπεδο, ενώ είναι μια πολύ ακριβής μέθοδος για τον προσδιορισμό της δριμύτητας της αποφρακτικής νόσου (Wolf, Sumner et al. 1972), δε μπορεί να εξετάσει καμία από τις άλλες παραμέτρους που πιθανώς να σχετίζονται με το συνολικό μέγεθος της "ισχαιμικής προσβολής" που παράγεται από την αποφρακτική νόσο που αξιολογεί.

Προηγούμενες μελέτες χωλαινόντων μυών με χρήση MRS έχουν επίσης δείξει σημαντικά αυξημένες σταθερές ρυθμού ανάνηψης για τις PCr και ADP (Hands, Bore et al. 1986; Zatina, Berkowitz et al. 1986; Williams, Fencil et al. 1990; Kemp, Thompson et al. 1993; Wahl, Simon et al. 1994). Στις περισσότερες όμως από αυτές τις μελέτες, οι ασθενείς ασκήθηκαν μέχρι μυϊκής εξάντλησης, χρησιμοποιώντας μάλιστα ισοτονικά πρωτόκολλα άσκησης, διαφορές που εισάγουν την προκληθείσα με την άσκηση ισχαιμία των μυών ως μια σημαντική συγγέουσα μεταβλητή. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι ερευνητές δεν προσπάθησαν να εξαγάγουν συγκεκριμένα συμπεράσματα για τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Η εργασία από τους Zatina και συνεργάτες, εντούτοις, αποτελεί μια ενδιαφέρουσα εξαίρεση (Zatina, Berkowitz et al. 1986). Οι MRS μετρήσεις ελήφθησαν λίγο πριν και λίγο μετά από τη χειρουργική επαναιμάτωση των κάτω μελών. Αν και η αιμοδυναμική του μέλους μετά την εγχείρηση επανήλθε αμέσως σε φυσιολογικά επίπεδα, δεν υπήρξε αντίστοιχη βελτίωση στους μιτοχονδριακούς δείκτες της οξειδωτικής λειτουργίας. Στηριζόμενη σε αυτά τα ευρήματα, η ομάδα του Zatina κατέληξε στο συμπέρασμα ότι "υπάρχει μια ανεπάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο μέλος μετά από τη χειρουργική επαναιμάτωση η οποία είναι ανεξάρτητη από την διόρθωση της ισχαιμίας". Εκείνη την περίοδο υπήρξε αβεβαιότητα σχετικά με την ακριβή σημασία του συγκεκριμένου ευρήματος, αλλά με βάση τα παρόντα ευρήματα από τη μελέτη μας, είναι σαφές ότι αυτή η "ανεπάρκεια" είναι μάλλον το αποτέλεσμα ύπαρξης παθολογικών μιτοχονδρίων στο χωλαίνοντα σκελετικό μυ. Αυτή η μιτοχονδριοπάθεια μπορεί να αποκαλυφθεί όταν τα χωλαίνοντα μέλη μελετώνται είτε υπό συνθήκες μιας πολύ ήπιας άσκησης, όπως στη δική μας μελέτη, είτε αμέσως μετά από χειρουργική επαναιμάτωση, όπως στην εργασία Zatina. Σε αυτές τις δύο περιπτώσεις, η μιτοχονδριακή λειτουργία μπορεί να μετρηθεί σε κατάσταση ελάχιστα διαταραγμένης ροής αίματος. Τα αποτελέσματα της εργασίας Zatina δείχνουν επίσης ότι αυτή η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία δεν είναι άμεσα αναστρέψιμη μετά από χειρουργική επαναιμάτωση.

Ευρήματα μελετών από άλλα εργαστήρια έχουν επίσης δείξει ότι οι σκελετικοί μύς στα μέλη ασθενών με ΠΑΑ υφίστανται σημαντικές μορφολογικές και μεταβολικές αλλαγές. Η μιτοχονδριακή δομή είναι ανώμαλη, το DNA είναι προσβεβλημένο, τα επίπεδα των ενζύμων μεταβάλλονται και η ενζυματική δραστηριότητα μπορεί να μην αυξηθεί φυσιολογικά ως απάντηση σε ενεργητική εργασιοθεραπεία του μέλους. Αυτά τα αποτελέσματα, σε συνδυασμό

με τα ευρήματά μας, υποστηρίζουν σθεναρά την ύπαρξη μιας ενδογενούς μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στο χωλαίνοντα μυ, πολύ παρόμοιας με εκείνες που έχουν περιγραφεί στις μιτοχονδριακές μυοπάθειες (Argov and Bank 1991; Brass and Hiatt 2000).

Παρ' ότι ο ρόλος της εν λόγω μιτοχονδριοπάθειας δεν είναι ακόμη απολύτως σαφής, φαίνεται ότι αυτή πιθανότατα αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία της διαλείπουσας χωλότητας. Η μείωση της μεταβολικής αποδοτικότητας είναι μάλλον υπεύθυνη για την αδυναμία της χειρουργικής επαναιμάτωσης να επαναφέρει σε φυσιολογικά επίπεδα την απόδοση στη βάδιση ασθενών με ΠΑΑ (Zatina, Berkowitz et al. 1986; Regensteiner, Hargarten et al. 1993). Επιπλέον, η βελτίωση αυτής της μεταβολικής “ατέλειας” μπορεί να είναι ο λόγος για τον οποίο η ενεργητική εργασιοθεραπεία και ορισμένα φάρμακα, όπως η πεντοξυφιλίνη, η σιλοσταζόλη και οι καρνιτίνες, βελτιώνουν την ικανότητα βάδισης των ασθενών με χωλότητα, χωρίς να τροποποιούν τις αιμοδυναμικές παραμέτρους των αγγείων (Porter, Cutler et al. 1982; Brevetti, Perna et al. 1995; Dawson, Cutler et al. 1998).

ΔΕΥΤΕΡΗ ΜΕΛΕΤΗ: Η πεντοξυφυλλίνη αντιστρέφει την παθολογική μιτοχονδριακή λειτουργία των χωλαινόντων μυών ασθενών με ΠΑΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 2^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

Η πρώτη μας μελέτη έδειξε παθολογική μιτοχονδριακή λειτουργία στους σκελετικούς μυς ασθενών με ΠΑΑ. Ο βαθμός στον οποίο αυτή η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να μετριασθεί ή και να αναστραφεί με φαρμακευτική παρέμβαση δεν έχει ακόμα μελετηθεί. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούμε για τη θεραπεία της διαλείπουσας χολότητας, ενώ δεν τροποποιούν την αιμοδυναμική των μεγάλων αγγείων και δεν έχουν καμία επίδραση σε αθηρωματικές πλάκες, εντούτοις βελτιώνουν την ικανότητα των ασθενών για βάδιση. Είναι επομένως εύλογο να υποθέσει κανείς ότι τα φάρμακα αυτά λειτουργούν στο κυτταρικό επίπεδο, βελτιώνοντας την βιοενεργητική κατάσταση του μυός (Brass 1996; Brass and Hiatt 2000; Pipinos, Shepard et al. 2000).

Η πεντοξυφυλλίνη, ένα παράγωγο της μεθυλοξανθίνης, είναι η πρώτη φαρμακευτική ουσία που εγκρίθηκε από την Επιτροπή Φαρμάκων και Τροφίμων (Food and Drug Administration) των Ηνωμένων Πολιτειών για τη θεραπεία της διαλείπουσας χολότητας. Μεγάλος αριθμός προοπτικών μελετών που πραγματοποιήθηκαν με τυχαιοποίηση δειγμάτων και ελεγχόμενες δοκιμές, έχει καταδείξει τη δυνατότητα της πεντοξυφυλλίνης να αυξάνει αποτελεσματικά την απόσταση που μπορούν να περπατήσουν οι ασθενείς με χολότητα (Ernst 1994; Hood, Moher et al. 1996). Η ειδική φαρμακευτική επίδραση της πεντοξυφυλλίνης στο χωλαίνοντα μυ και στη βιοενεργητική του κατάσταση δεν έχει αποσαφηνιστεί επαρκώς (Aviado and Dettelbach 1984; Radack and Wyderski 1990), παρά το ότι έχει προταθεί ότι σχετίζεται με κάποια βελτίωση στην ευελιξία και στις ιδιότητες ροής των συστατικών του αίματος (Aviado and Dettelbach 1984; Ernst 1994). Υποθέσαμε ότι σε ένα σημαντικό βαθμό η αποτελεσματικότητα της πεντοξυφυλλίνης έγκειται στη θετική της επίδραση στη μιτοχονδριοπάθεια των χωλαινόντων μυών. (Pipinos, Boska et al. 2002).

ΜΕΘΟΔΟΙ 2^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

Χαρακτηριστικά ασθενών

Δέκα ασθενείς με ΠΑΑ και ήπια προς μέτρια διαλείπουσα χολόληθα επιλέχθηκαν από τα εξωτερικά ιατρεία της αγγειοχειρουργικής κλινικής. Όπως και στην πρώτη μας μελέτη, ήταν όλοι άντρες, μη διαβητικοί, με $0,5 \leq \text{ABI} \leq 0,8$. Είχαν μέσο όρο ηλικίας 62 ± 3 χρόνια (φάσμα μεταξύ 48-79 χρόνια), μέσο όρο $2,5 \pm 0,3$ παραγόντων κινδύνου για ΠΑΑ και μέση διάρκεια συμπτωμάτων χολόληθας $2,5 \pm 0,6$ χρόνια. Οι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν σακχαρώδη διαβήτη, αρτηριακή υπέρταση, κάπνισμα, δυσλιπιδαιμία, νόσο των στεφανιαίων αγγείων, παχυσαρκία και οικογενειακό ιστορικό επιπλοκών από αθηροσκληρωτική νόσο. Όλοι οι ασθενείς είχαν ικανοποιητικό έλεγχο των χρόνιων προβλημάτων υγείας τους πριν την εγγραφή στη μελέτη. Οι συμμετέχοντες συγκεκριμένα συμφώνησαν να μη μεταβάλλουν κανέναν από τους παράγοντες κινδύνου τους και να μην υποβληθούν σε θεραπευτικές παρεμβάσεις (αλλαγές στις συνήθειες καπνίσματος, θεραπεία μέσω άσκησης, λήψη νέων φαρμάκων, έναρξη άλλης θεραπείας για τον έλεγχο του διαβήτη, της υπέρτασης και της δυσλιπιδαιμίας), προκειμένου να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο μεταβολής της αντοχής τους κατά την άσκηση ή της βιοενεργητικής κατάστασης των μυών τους κατά τη διάρκεια των 12 εβδομάδων της μελέτης. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής του νοσοκομείου και οι ασθενείς υπέγραψαν ειδικά έντυπα συγκατάθεσης για τη συμμετοχή τους στην έρευνα.

Θεραπεία

Οι ασθενείς έλαβαν 400 mg πεντοξυφυλλίνης, 3 φορές/ημέρα, για 12 συνεχείς εβδομάδες. Η συμμόρφωση των ασθενών με τη δόση επιβεβαιώθηκε με εβδομαδιαίες τηλεφωνικές κλήσεις και μετρήσεις των χαπιών κατά την κλινική επίσκεψη, 6 εβδομάδες μετά την έναρξη της φαρμακευτικής θεραπείας.

Μέτρηση αποτελεσμάτων

Η ανταπόκριση στη θεραπεία με πεντοξυφυλλίνη μελετήθηκε με τη χρήση κυλιόμενου τάπητα και MRS. Και οι δύο μελέτες έλαβαν χώρα πριν την έναρξη και αμέσως μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας των 12 εβδομάδων.

Μετρήσεις αποστάσεων βάρδισης με χρήση κυλιόμενου τάπητα

Οι ασθενείς περπάτησαν σε κεκλιμένο κυλιόμενο τάπητα (12,5 μοίρες), με ταχύτητα 2,5 km/h και για διάρκεια συνολικά 5 min ή λιγότερο αν ο πόνος τους ανάγκαζε να σταματήσουν. Οι παράμετροι που υπολογίσθηκαν ήταν: (α) αρχικός ABI (β) ABI ένα λεπτό μετά την ολοκλήρωση της άσκησης (γ) μέγιστη ελάττωση των ABI (δ) χρόνος που απαιτείται για να επανέλθουν οι ABI στις αρχικές τιμές. Μετά την ολοκλήρωση της αρχικής δοκιμασίας σε κυλιόμενο τάπητα και ένα χρονικό διάστημα 30 min για ξεκούραση, οι ασθενείς περπάτησαν ξανά στον κυλιόμενο τάπητα με σκοπό να μετρηθεί η αρχική και η μέγιστη απόσταση χωλότητας. Η αρχική απόσταση προ εμφάνισης χωλότητας είναι το μήκος που μπορεί να περπατήσει ένας ασθενής υπό τις παραπάνω καθορισμένες συνθήκες μέχρι να αρχίσει να αισθάνεται μυϊκό πόνο. Η μέγιστη απόσταση χωλότητας είναι η μέγιστη απόσταση που μπορεί να διανύσει ο ασθενής, μέχρι ο πόνος στο χωλαίνον μέλος να τον αναγκάσει να σταματήσει.

Έλεγχος με MRS

Χρησιμοποιήσαμε MRS και το ίδιο πρωτόκολλο άσκησης που χρησιμοποιήθηκε και στην πρώτη μας μελέτη. Η άσκηση σχεδιάστηκε να είναι πολύ χαμηλής έντασης ώστε οι απαιτήσεις των μυών της κνήμης για οξυγόνο να μην υπερβαίνουν την ικανότητα για αιματική παροχή του πάσχοντος αρτηριακού δένδρου, επιτρέποντας την άμεση μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας χωρίς τις επιδράσεις της μυϊκής ισχαιμίας. Η βιοενεργητική κατάσταση των μυών της κνήμης εξετάστηκε στο περισσότερο ισχαιμικό μέλος (το μέλος με τον χαμηλότερο ABI). Συνεχόμενες μετρήσεις λήφθηκαν αρχικά σε ηρεμία, στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της ισομετρικής άσκησης και τέλος στη διάρκεια των πέντε πρώτων λεπτών της ανάρρωσης από την άσκηση. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν νήστες και απείχαν από την καφεΐνη για τουλάχιστον 6 ώρες πριν τη μελέτη.

Περιγραφή συσκευής MRS

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ολόσωμο μαγνήτη έντασης 3 Τέσλα, (Magnex Scientific) με τη βοήθεια ειδικής κονσόλας εικονοληψίας και ανάλυσης (Surrey Medical imaging Systems, Surrey, UK). Η άσκηση που χρησιμοποιήσαμε είναι η ίδια με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη μας μελέτη (Boska 1994; Boska, Nelson et al. 1999; Pipinos,

Shepard et al. 2000). En συντομία, το υπό μελέτη μέλος τοποθετήθηκε σε μία εργομετρική διάταξη που αποτελούνταν από ένα ανοιχτό ισομετρικό εργόμετρο με έναν μετατροπέα /αναλυτή δυνάμεων (Tedeo No. 1250, 300 gr) . Για την καταγραφή των φασματοσκοπικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ένα επαγωγικό σύρμα διπλής επιφάνειας, συντονισμένο στη μαγνητική συχνότητα των ατόμων φωσφόρου (51,7 Mhz στα 3,0 T). Τα κάτω μέλη των ασθενών τοποθετήθηκαν στη συσκευή με το γόνατο σε έκταση και το επαγωγικό σύρμα εφαρμοσμένο χαλαρά πάνω στους οπίσθιους κνημιαίους μυς. Οι ασθενείς πραγματοποίησαν συνολικά τρεις ισομετρικές ασκήσεις πελματιαίας κάμψης. Κάθε μία από τις ασκήσεις διήρκησε 90 δευτερόλεπτα, με διαλείμματα ξεκούρασης διάρκειας 15 λεπτών μεταξύ των ασκήσεων. Τα φάσματα του φωσφόρου καταγράφηκαν με ρυθμό ένα φάσμα ανά δευτερόλεπτο, πριν, κατά τη διάρκεια και μετά το τέλος κάθε άσκησης.

Ανάλυση φασμάτων MRS

Για την ανάλυση των φασμάτων ακολουθήσαμε την ίδια μεθοδολογία με αυτήν του πρώτου μας πειράματος.

Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της θεραπείας με πεντοξυφυλλίνη, όπως μετρήθηκαν με τις δοκιμασίες κυλιόμενου τάπητα και MRS, συγκρίθηκαν με τη βοήθεια paired t-test με τις αντίστοιχες μετρήσεις που λήφθηκαν πριν από την έναρξη της θεραπείας. Τα ποσοστά βελτίωσης στις παραμέτρους κυλιόμενου τάπητα και MRS, μετά από τη θεραπεία με πεντοξυφυλλίνη, συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες μετρήσεις που λήφθηκαν πριν από την έναρξη της θεραπείας με χρήση της συσχέτισης Pearson's. Τιμές $P < 0,05$ θεωρήθηκαν ενδεικτικές σημαντικής συσχέτισης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ σταθερά σφάλματα. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Sigmastat and Sigmaplot (Jandel corporation).

Πίνακας 2. Μετρήσεις με κυλιόμενο τάπητα πριν και μετά από θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη σε όλους τους ασθενείς. PTX = πεντοξιφυλλίνη, ABI = δείκτης πιέσεων σφυρών

Παράμετροι κυλιόμενου τάπητα (n=10)	Πριν PTX	Μετά PTX	Τιμή P
ABI	0,67±0,03	0,71±0,03	0,168
Αρχική απόσταση προ εμφάνισης χωλότητας (meters)	98±32	249±108	0,122
Μέγιστη απόσταση χωλότητας (meters)	310±71	497±161	0,120
% ABI πτώση μετά από την άσκηση	58±9	52±9	0,214
ABI ένα λεπτό μετά από την άσκηση	0,30±0,07	0,34±0,07	0,225
Χρόνος ανάνηψης ABI (min)	11,4±3,3	12,1±2,9	0,700

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

Μετρήσεις με κυλιόμενο τάπητα (Πίνακας 2)

Όλες οι παράμετροι κυλιόμενου τάπητα που μετρήθηκαν πριν από την έναρξη θεραπείας με πεντοξιφυλλίνη επιβεβαίωσαν την παρουσία μέτριας διαλείπουσας χωλότητας στην υπό μελέτη ομάδα. Μετά από 12 εβδομάδες θεραπείας με πεντοξιφυλλίνη η αρχική απόσταση προ εμφάνισης χωλότητας αυξήθηκε κατά 126% ($P=0,12$) και η μέγιστη απόσταση χωλότητας αυξήθηκε κατά 45% ($P=0,12$).

Μετρήσεις MRS

(α) Μετρήσεις πριν την έναρξη της θεραπείας

Κατά τη διάρκεια της άσκησης το pH του κυττάρου και η αναερόβια παραγωγή ATP παρέμειναν σε φυσιολογικές τιμές, επιβεβαιώνοντας ότι η άσκηση που χρησιμοποιήσαμε δεν προκάλεσε σημαντική μυϊκή ισχαιμία (πίνακας 3). Το ATP που καταναλώθηκε κατά τη διάρκεια της άσκησης αναπαρήχθη με ένα φυσιολογικό συνδυασμό των μεταβολικών οδών της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της αναερόβιας γλυκόλυσης και της κρεατινικής κινάσης (πίνακας 2). Οι σταθερές ρυθμού ανάνηψης των PCr και ADP, παρ' όλα αυτά ήταν παθολογικά χαμηλές, κάτι που δηλώνει σημαντικά μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία (πίνακας 2).

Όπως και στην πρώτη μας μελέτη, δεν είχαν όλοι οι ασθενείς παθολογική μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Με βάση τις σταθερές ρυθμού ανάνηψης των PCr και ADP, οι ασθενείς μπορούν να διαιρεθούν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από επτά ασθενείς που είχαν παθολογικές προ θεραπείας σταθερές ρυθμού ανάνηψης PCr και ADP (πίνακας 3). Οι ασθενείς σ' αυτή την ομάδα είχαν μέσο όρο ηλικίας 60 ± 4 έτη, μέση διάρκεια των συμπτωμάτων χωλότητας $3\pm 0,7$ έτη και μέσο όρο $2,3\pm 0,4$ παραγόντων κινδύνου για ΠΑΑ. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τους υπόλοιπους τρεις ασθενείς των οποίων οι μιτοχονδριακοί δείκτες κυμαίνονταν μέσα στις κατώτερες φυσιολογικές τιμές (πίνακας 4). Αυτοί οι ασθενείς είχαν μέση ηλικία 66 ± 6 έτη, μέση διάρκεια συμπτωμάτων χωλότητας $1,3\pm 0,3$ έτη και μέσο όρο $3,0\pm 0,0$ παραγόντων κινδύνου για ΠΑΑ.

(β) Ανταπόκριση στη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη

Οι μιτοχονδριακοί δείκτες ολόκληρης της ομάδας βελτιώθηκαν μετά τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη, αν και αυτές οι αλλαγές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (**Πίνακας 2**). Στην ομάδα των ασθενών με την αρχικά παθολογική μιτοχονδριακή λειτουργία, οι μιτοχονδριακοί δείκτες παρουσίασαν σημαντική βελτίωση μετά τη θεραπεία, με τιμές που προσέγγισαν τα φυσιολογικά όρια (**Πίνακας 4**). Σε αυτούς τους ασθενείς η πεντοξιφυλλίνη βελτίωσε τις σταθερές ρυθμού ανάνηψης της PCr κατά $107 \pm 42\%$ και του ADP κατά $66 \pm 22\%$. Επιπρόσθετα, η πεντοξιφυλλίνη αύξησε τη χρήση οξειδωτικής φωσφορυλίωσης με μια αντίστοιχη πτώση στην αναερόβια γλυκόλυση, αν και αυτές οι αλλαγές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Στους 3 ασθενείς με φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία, οι μιτοχονδριακοί δείκτες δε βελτιώθηκαν μετά από τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη και στην πραγματικότητα επιδεινώθηκαν ελαφρώς, παρ' όλο που παρέμειναν μέσα στα φυσιολογικά όρια (**Πίνακας 5**).

(γ) Συσχετισμός των αρχικών δεικτών της μιτοχονδριακής λειτουργίας με τη βελτίωση μετά από τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη

Υπήρξε μια στατιστικώς σημαντική τάση για καλύτερα αποτελέσματα στους ασθενείς με την αρχικά φτωχότερη μιτοχονδριακή λειτουργία. Με άλλα λόγια, όσο περισσότερο επηρεασμένη είναι αρχικά η μιτοχονδριακή λειτουργία και συνεπώς η οξειδωτική φωσφορυλίωση, τόσο μεγαλύτερη είναι η βελτίωση που παρατηρείται μετά από θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 3: Σύγκριση παραμέτρων MRS σε όλους τους ασθενείς (n=10) πριν και μετά από θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη. PTX = πεντοξιφυλλίνη, PCr = φωσφοκρεατίνη, Pi = ανόργανος φωσφόρος, ADP = αδενοσινοδιφωσφορικό, AnGly = αναερόβια γλυκόλυση, CK = οδός κρεατινικής κινάσης, OxPhos = οξειδωτική φωσφορύλωση.

* Φυσιολογικές τιμές PCr σταθεράς ρυθμού ανάνηψης = $0,015 - 0,0045 \text{ sec}^{-1}$

+ Φυσιολογικές τιμές ADP σταθεράς ρυθμού ανάνηψης = $0,024 - 0,048 \text{ sec}^{-1}$

MRS παράμετροι σε όλους τους ασθενείς (n=10)	Πριν PTX	Μετά PTX	Τιμή P
--	----------	----------	--------

Επίπεδα στο τέλος της άσκησης

PCr (mM)	18,72±1,60	19,54±1,49	0,680
Pi (mM)	11,28±1,23	11,19±0,89	0,931
ADP (μM)	40,59±0,02	36,26±5,24	0,322
PH	7,11±0,02	7,11±0,01	0,783

Μεταβολισμός κατά την άσκηση

An Gly (mM/s)	0,132±0,018	0,124±0,014	0,692
CK (mM/s)	0,065±0,009	0,070±0,008	0,677
Ox Phos (mM/s)	0,124±0,023	0,120±0,014	0,876

Ανάνηψη

PCr σταθερά ρυθμού ανάνηψης (s^{-1})*	0,014±0,003	0,016±0,002	0,601
ADP σταθερά ρυθμού ανάνηψης (s^{-1})+	0,023±0,005	0,026±0,002	0,654

Πίνακας 4: Σύγκριση παραμέτρων MRS σε ασθενείς με παθολογική μιτοχονδριακή δραστηριότητα (n=7) πριν και μετά από θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη. PTX = πεντοξιφυλλίνη, PCr = φωσφοκρεατίνη, Pi = ανόργανος φωσφόρος, ADP = αδενοσινοδιφοσφορικό, AnGly = αναερόβια γλυκόλυση, CK = οδός κρεατινικής κινάσης, OxPhos = οξειδωτική φωσφορυλίωση.

MRS παράμετροι σε ασθενείς με παθολογική
μιτοχονδριακή δραστηριότητα (n=7)

Πριν PTX

Μετά PTX

Τιμή P

Επίπεδα στο τέλος της άσκησης

PCr (mM)	17,87±2,20	18,85±1,95	0,647
Pi (mM)	12,30±1,62	11,21±0,89	0,358
ADP (μM)	45,90±9,71	38,23±7,14	0,197
pH	7,10±0,02	7,11±0,02	0,609

Μεταβολισμός κατά την άσκηση

An Gly (mM/s)	0,140±0,025	0,127±0,013	0,607
CK (mM/s)	0,066±0,011	0,064±0,006	0,886
Ox Phos (mM/s)	0,088±0,019	0,113±0,014	0,345

Ανάνηψη

PCr σταθερά ρυθμού ανάνηψης (s ⁻¹)*	0,009±0,002	0,013±0,002	0,013
ADP σταθερά ρυθμού ανάνηψης (s ⁻¹) ⁺	0,015±0,002	0,022±0,002	0,004

Πίνακας 5: Σύγκριση παραμέτρων MRS σε ασθενείς με φυσιολογική μιτοχονδριακή δραστηριότητα (n=3) πριν και μετά από θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη. PTX = πεντοξιφυλλίνη, PCr = φωσφοκρεατίνη, Pi = ανόργανος φωσφόρος, ADP = αδενοσινοδιφωσφορικό, AnGly = αναερόβια γλυκόλυση, CK = οδός κρεατινικής κινάσης, OxPhos = οξειδωτική φωσφορυλίωση.

MRS παράμετροι σε ασθενείς με φυσιολογική μιτοχονδριακή δραστηριότητα (n=3)

Πριν PTX Μετά PTX Τιμή P

Επίπεδα στο τέλος της άσκησης

PCr (mM)	21,22±0,83	21,16±2,19	0,986
Pi (mM)	8,87±0,32	11,53±1,50	0,234
ADP (μM)	28,20±3,86	31,65±6,36	0,485
pH	7,13±0,01	7,12±0,01	0,678

Μεταβολισμός κατά την άσκηση

An Gly (mM/s)	0,114±0,024	0,116±0,039	0,961
CK (mM/s)	0,060±0,018	0,082±0,025	0,526
Ox Phos (mM/s)	0,208±0,025	0,138±0,037	0,105

Ανάνηψη

PCr σταθερά ρυθμού ανάνηψης (s ⁻¹)*	0,028±0,005	0,021±0,002	0,344
ADP σταθερά ρυθμού ανάνηψης (s ⁻¹) ⁺	0,045±0,011	0,033±0,011	0,383

Πίνακας 6. Συσχετισμός των αρχικών δεικτών της μιτοχονδριακής λειτουργίας με το % βελτίωσης μετά από τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη (n=10). PTX = πεντοξιφυλλίνη, PCr = φωσφοκρεατίνη, ADP = αδενοσινοδιφωσφορικό, r = σταθερά συσχετισμού (αρνητική σταθερά συσχετισμού μεταξύ δύο παραμέτρων δηλώνει ότι όσο χαμηλότερη είναι η τιμή της μιας παραμέτρου, τόσο υψηλότερη είναι η τιμή της άλλης παραμέτρου)

Παράμετροι MRS	Συσχετισμός των αρχικών δεικτών της μιτοχονδριακής λειτουργίας με το % βελτίωσης μετά PTX
PCr σταθερά ρυθμού ανάνηψης	r = -0,803, P = 0,005
ADP σταθερά ρυθμού ανάνηψης	r = -0,764, P = 0,010
Οξειδωτική φωσφορυλίωση	r = -0,811, P = 0,004

Πίνακας 7. Συσχετισμός μεταξύ σχετικής βελτίωσης των παραμέτρων κυλιόμενου τάπητα και δεικτών της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη (n=10). PTX = πεντοξιφυλλίνη, PCr = φωσφοκρεατίνη, ADP = αδενοσινοδιφωσφορικό, r = σταθερά συσχετισμού (θετική σταθερά συσχετισμού μεταξύ δύο παραμέτρων δηλώνει ότι όσο υψηλότερη είναι η τιμή της μιας παραμέτρου, τόσο υψηλότερη είναι και η τιμή της άλλης παραμέτρου)

	% βελτίωσης στην αρχική απόσταση προ εμφάνισης χωλότητας	% βελτίωσης στη μέγιστη απόσταση χωλότητας
% βελτίωσης στη σταθερά ρυθμού ανάνηψης PCr μετά PTX	r = 0,770, P = 0,009	r = 0,651, P = 0,041
% βελτίωσης στη σταθερά ρυθμού ανάνηψης ADP μετά PTX	r = 0,649, P = 0,042	r = 0,765, P = 0,009

(δ) Συσχετισμός μεταξύ σχετικής βελτίωσης των παραμέτρων κυλιόμενου τάπητα και δεικτών της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετά από τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη (Πίνακας 7). Υπήρξε ένας στατιστικά σημαντικός συσχετισμός μεταξύ του ποσοστού της βελτίωσης της μιτοχονδριακής λειτουργίας και της αύξησης στις αποστάσεις χωλότητας. Πιο συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη είναι η βελτίωση της μιτοχονδριακής αποδοτικότητας μετά τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη, τόσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση στις αποστάσεις χωλότητας. Αν και οι αποστάσεις χωλότητας των ασθενών και από τις δύο ομάδες αυξήθηκαν με την πεντοξιφυλλίνη, η ομάδα με την παθολογική αρχικά μιτοχονδριακή λειτουργία είχε σχεδόν διπλάσιο όφελος. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με παθολογικά μιτοχόνδρια είχαν μια αύξηση της τάξεως $146 \pm 92\%$ στην αρχική απόσταση προ εμφάνισης χωλότητας (σε σχέση με $79 \pm 23\%$ στους ασθενείς με φυσιολογικούς αρχικούς μιτοχονδριακούς δείκτες) και μια αύξηση της τάξεως $53 \pm 31\%$ στη μέγιστη απόσταση χωλότητας (σε σχέση με $28 \pm 14\%$ στους ασθενείς με φυσιολογική αρχικά μιτοχονδριακή λειτουργία).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 2^η ΜΕΛΕΤΗΣ

Η πεντοξιφυλλίνη είναι το πρώτο και ευρύτερα συνταγογραφούμενο φάρμακο για τη θεραπεία της διαλείπουσας χωλότητας. Αν και αυτό το φάρμακο έχει διάφορες γνωστές δράσεις, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο βελτιώνει τις επιδόσεις κατά την άσκηση στην ΠΑΑ είναι άγνωστος. Η ομάδα μας υπέθεσε ότι η αποτελεσματικότητα της πεντοξιφυλλίνης οφείλεται εν μέρει στη βελτίωση της μιτοχονδριοπάθειας που έχουμε παρατηρήσει σε μυς ασθενών με αρτηριακή νόσο.

Η τυποποιημένη άσκηση με κυλιόμενο τάπητα χρησιμοποιήθηκε πριν και μετά από τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη για να αξιολογήσει τη βαρύτητα της αρτηριακής αποφρακτικής νόσου και το βαθμό της υφιστάμενης λειτουργικής επιδείνωσης στο βάδισμα των ασθενών. Η μέθοδος MRS χρησιμοποιήθηκε για να εξετάσει τη βιοενεργητική κατάσταση των μυών πριν και μετά από τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη. Το πρωτόκολλο άσκησης που χρησιμοποιήθηκε, σχεδιάστηκε συγκεκριμένα για να κάνει δυνατή την πραγματοποίηση της άσκησης μέσα στο μαγνητικό πεδίο και με πολύ χαμηλή απαίτηση οξυγόνωσης μυών, επιτρέποντας την άμεση μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας χωρίς τις συγχέουσες επιδράσεις της ισχαιμίας.

Η αρχική άσκηση με κυλιόμενο τάπητα επιβεβαίωσε την παρουσία μέτριας διαλείπουσας χωλότητας σε όλους τους ασθενείς. Μετά από 12 εβδομάδες θεραπείας με πεντοξιφυλλίνη, οι αποστάσεις χωλότητας αυξήθηκαν εντυπωσιακά (πίνακας 1). Αν και αυτές οι μεταβολές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($P=0,12$), αυτό μάλλον οφείλεται στο γεγονός ότι μελετήσαμε ένα πολύ μικρό αριθμό ασθενών. Όπως αναμενόταν, οι ABI σε ανάπαυση και μετά από άσκηση σε κυλιόμενο τάπητα δεν άλλαξαν με τη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη δεδομένου ότι η πεντοξιφυλλίνη δεν τροποποιεί την αιμοδυναμική των μεγάλων αγγείων και δεν έχει καμία επίδραση σε αθηρωματικές πλάκες.

Οι προεγχειρητικές μετρήσεις της μιτοχονδριακής οξειδωτικής ικανότητας (σταθερές ρυθμού ανάνηψης των PCr και ADP) ήταν παθολογικά χαμηλές για ολόκληρη την ομάδα που μελετήθηκε. Εντούτοις, δεν είχαν όλοι οι ασθενείς ανώμαλη αρχική μιτοχονδριακή λειτουργία. Τρεις ασθενείς είχαν μιτοχονδριακούς δείκτες που κυμαίνονταν μέσα στις φυσιολογικές τιμές, ενώ επτά είχαν παθολογικούς δείκτες. Στους ασθενείς με παθολογική αρχικά μιτοχονδριακή λειτουργία, οι τιμές των σταθερών ρυθμού ανάνηψης των PCr και ADP έγιναν σχεδόν φυσιολογικές μετά από θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη ($P<0,05$). Η θετική επίδραση της πεντοξιφυλλίνης στη μιτοχονδριακή λειτουργία αυτών των ασθενών εκδηλώθηκε επίσης με μια αύξηση $59\pm 29\%$ της παραγωγής ATP από οξειδωτική φωσφορυλίωση, με αντίστοιχη πτώση στην παραγωγή ATP από αναερόβια γλυκόλυση. Οι ασθενείς με φυσιολογική αρχικά μιτοχονδριακή λειτουργία είχαν ελάχιστη ανταπόκριση στην πεντοξιφυλλίνη. Συγκεκριμένα, οι σταθερές ρυθμού ανάνηψης των PCr και ADP δε βελτιώθηκαν. Αυτά τα στοιχεία καταδεικνύουν μια συγκεκριμένη θετική επίδραση της πεντοξιφυλλίνης στον παθολογικό μιτοχονδριακό μεταβολισμό του μυός γι' αυτό και ασθενείς με χωλότητα και ελαττωματικά μιτοχόνδρια αποτελούν την υποομάδα ασθενών με ΠΑΑ που ανταποκρίνεται καλύτερα στη θεραπεία με πεντοξιφυλλίνη. Όσο χειρότερη μάλιστα είναι η μιτοχονδριοπάθεια στο χωλαίνοντα μυ (όσο περισσότερα ελαττωματικά μιτοχόνδρια υπάρχουν), τόσο μεγαλύτερη είναι η βελτίωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας που επιφέρει η πεντοξιφυλλίνη και τόσο μεγαλύτερο είναι κατ' επέκταση το όφελος των ασθενών, το οποίο εκδηλώνεται κλινικά με αντίστοιχη αύξηση των αποστάσεων χωλότητας. Επομένως, η πεντοξιφυλλίνη εμφανίζεται να θεραπεύει ειδικά, και σε

ένα μεγάλο βαθμό να αντιστρέφει, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία του χωλαίνοντος σκελετικού μυός. Η βελτιωμένη βιοενεργητική κατάσταση των μυών συνδέεται με τη σειρά της με σημαντική βελτίωση των αποστάσεων που μπορούν να βαδίσουν οι ασθενείς με ΠΑΑ.

Ο μηχανισμός δράσης και η εκλεκτική αυτή επίδραση της πεντοξιφυλλίνης στα παθολογικά μιτοχόνδρια δεν έχουν διευκρινισθεί πλήρως. Η βελτίωση των ιδιοτήτων ροής του αίματος, αν και είναι ένας πιθανός μηχανισμός, δε φαίνεται να εξηγεί πλήρως την εκλεκτικότητα δράσης της πεντοξιφυλλίνης στα πιο εξασθενημένα μιτοχόνδρια. Οι γνωστές, επίσης, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της πεντοξιφυλλίνης θα μπορούσαν να θεωρηθούν υπεύθυνες ως ένα βαθμό για την αντιστροφή των μακροπρόθεσμων αρνητικών επιδράσεων των χρονίων επαναλαμβανόμενων επεισοδίων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στα μιτοχόνδρια των χωλαινόντων μυών. (Sullivan, Carper et al. 1988; Han, Thompson et al. 1990; Ciuffetti, Mercuri et al. 1991). Τέλος, κάποιου είδους άμεση επίδραση που θα μπορούσε να προκαλεί αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας είναι μια άλλη πιθανότητα, αλλά ο ακριβής μηχανισμός μιας τέτοιας δράσης δεν είναι σαφής.

Και η δεύτερη μελέτη μας καταδεικνύει ότι η πλειοψηφία των ασθενών με χωλότητα έχει μια ενδογενή μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Αυτή η μιτοχονδριοπάθεια βελτιώνεται σημαντικά με πεντοξιφυλλίνη κατά τρόπο μάλλον ανεξάρτητο από τις αιμορεολογικές δράσεις της, εισάγοντας έναν ενδεχομένως νέο τρόπο δράσης για αυτό το φάρμακο στη θεραπεία της διαλείπουσας χωλότητας. Οι βελτιώσεις που επιφέρει η πεντοξιφυλλίνη στις αποστάσεις χωλότητας είναι συνδεδεμένες με αντίστοιχες βελτιώσεις στην παθολογία των μιτοχονδρίων. Επομένως, ασθενείς με διαλείπουσα χωλότητα και ελαττωματικά μιτοχόνδρια στους σκελετικούς τους μυς μπορεί να αποτελέσουν το υποσύνολο εκείνο του πληθυσμού των ασθενών με ΠΑΑ, που θεραπεύεται αποτελεσματικότερα με την πεντοξιφυλλίνη.

ΤΡΙΤΗ ΜΕΛΕΤΗ: Βιοχημικές μέθοδοι καταδεικνύουν παθολογική λειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνοής στους σκελετικούς μυς ασθενών με ΠΑΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 3^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο βασικός περιορισμός του MRS είναι ότι το εξωμιτοχονδριακό περιβάλλον δε μπορεί να μετρηθεί, αλλά ούτε και να ελεγχθεί. Επιπλέον, αν το πρωτόκολλο για τις ασκήσεις δεν έχει σχεδιασθεί και ρυθμισθεί προσεκτικά σε όλες του τις λεπτομέρειες, μπορεί να προκαλέσει μεταβολές της αιματικής ροής και διαταραχή της βιονεργητικής κατάστασης (σε ηρεμία και κατά την άσκηση), κάνοντας την ερμηνεία των όποιων δεδομένων εξαιρετικά δύσκολη. Για την περαιτέρω επαλήθευση και χαρακτηρισμό της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων στην ΠΑΑ, προχωρήσαμε στο σχεδιασμό ενός τρίτου πειράματος, στο οποίο χρησιμοποιούμε βιοχημικές τεχνικές για την *in vitro* εκτίμηση της μιτοχονδριακής αναπνοής σε νωπά δείγματα σκελετικών μυών. Τα δείγματα υποβάλλονται σε μηχανική και χημική παρασκευή για να παρασκευαστούν γυμνές αποφλοιωμένες μυϊκές ίνες. Αυτή η διαδικασία αφαιρεί την σαρκοπλασματική μεμβράνη και το κυτοσόλιο, αλλά διατηρεί ταυτόχρονα τη δομή του μιτοχονδρίου και των άλλων ενδοκυττάρων οργανιδίων, καθιστώντας έτσι προσβάσιμο όλο το μιτοχονδριακό πληθυσμό. Ως εκ τούτου, κάνει δυνατή την άμεση μελέτη της αναπνευστικής μιτοχονδριακής λειτουργίας με πλήρη έλεγχο του μιτοχονδριακού περιβάλλοντος (Veksler, Kuznetsov et al. 1987; Kunz, Kuznetsov et al. 1993; Saks, Veksler et al. 1998; Kuznetsov, Strobl et al. 2002). Η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια των παρασκευασμένων ινών εκτιμήθηκε *in vitro* με πολαρογραφία (Pipinos, Sharov et al. 2003).

Μελετήσαμε ασθενείς με πιο προχωρημένη ΠΑΑ, σε σύγκριση με αυτούς που είχαν μελετηθεί στα πρώτα δύο πειράματα. Το ενδιαφέρον μας συγκεκριμένα εστιάστηκε σε ασθενείς με βαριά διαλείπουσα χωλότητα (χωλότητα που επέρχεται μετά από πολύ μικρές αποστάσεις) ή με κρίσιμη ισχαιμία (εκδηλώνεται με άλγος ανάπαυσης, έλκη και γάγγραινα). Αυτοί οι ασθενείς έχουν ενδείξεις είτε για χειρουργική επαναιμάτωση, είτε στις πιο σοβαρές περιπτώσεις για ακρωτηριασμό, προκειμένου να ελεγχθούν οι επιπλοκές της ισχαιμίας.

ΜΕΘΟΔΟΙ 3^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

Ομάδα ασθενών

Στρατολογήσαμε 9 ασθενείς (10 μέλη) που υποβλήθηκαν σε εγχείρηση λόγω προχωρημένης ισχαιμίας (χωλότητα που περιόριζε την καθημερινή δραστηριότητα, πόνος σε ηρεμία, ή ιστική απώλεια) (πίνακας 1). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 65 έτη. Κάθε ασθενής είχε κατά μέσο όρο 2,5 παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση. Οι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων σακχαρώδη διαβήτη, αρτηριακή υπέρταση, κάπνισμα, δυσλιπιδαιμία, νόσο των στεφανιαίων αγγείων, παχυσαρκία και οικογενειακό ιστορικό επιπλοκών από αθηροσκληρωτική νόσο. Έξι ασθενείς (6 μέλη) υποβλήθηκαν σε μηροϊγνυακή ή μηροκνημιαία παράκαμψη και οι υπόλοιποι τρεις (4 μέλη) σε ακρωτηριασμό. Η διάγνωση της περιφερικής αρτηριακής νόσου ήταν αντικειμενικά τεκμηριωμένη με βάση ένα συνδυασμό θετικού ιστορικού, θετικών ευρημάτων κατά τη φυσική εξέταση, και σημαντικά μειωμένου δείκτη πίεσης σφυρών (ABI κατά μέσο όρο 0,4) ή μειωμένης συστολικής πίεσης στα δάχτυλα των ποδιών. Επιπλέον, αγγειογραφική μελέτη είχε διενεργηθεί σε 7 από τους 9 ασθενείς (7 μέλη). Τα ευρήματα ήταν ενδεικτικά μηροϊγνυακής αποφρακτικής νόσου σε 5 ασθενείς (5 μέλη) και συνδυασμένης μηροϊγνυακής και κνημιαίας νόσου στους υπόλοιπους 4 ασθενείς (5 μέλη).

Ομάδα ελέγχου

Στρατολογήσαμε 9 ασθενείς (9 μέλη) χωρίς αποφρακτική νόσο, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε εγχείρηση των κάτω μελών λόγω άλλων ενδείξεων. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 47 έτη. Κάθε ασθενής είχε κατά μέσο όρο έναν παράγοντα κινδύνου για αθηροσκλήρωση. Έξι ασθενείς είχαν φλεβική νόσο των κάτω μελών, 2 ασθενείς είχαν ορθοπεδικά προβλήματα και ένας ασθενής είχε τραύμα κάτω μέλους. Αυτοί οι ασθενείς δεν είχαν ιστορικό συμπτωμάτων αποφρακτικής νόσου και είχαν φυσιολογική φυσική εξέταση και μη επεμβατικές δοκιμασίες ($ABI \geq 1,0$) κάτω μελών, τόσο σε ηρεμία όσο και μετά από δοκιμασία κόπωσης. Όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν ειδικά έντυπα συγκατάθεσης για τη συμμετοχή τους στην έρευνα, τα οποία εγκρίθηκαν από την επιτροπή βιοηθικής του νοσοκομείου.

Τεχνική συλλογής νωπού μυϊκού δείγματος

Τα μυϊκά δείγματα πάρθηκαν από το γαστροκνήμιο μυ, ο οποίος παρασκευάστηκε κατά την διάρκεια χειρουργικής επέμβασης του ασθενούς. Όλα τα δείγματα του μυός πάρθηκαν από το πρόσθιο και έσω χείλος της γαστέρας του, περίπου 10 cm περιφερικά της ακρολοφίας της κνήμης. Η ίδια εγχειρητική τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή νωπού μυϊκού δείγματος από όλους τους ασθενείς.

Προετοιμασία των μυών για μέτρηση της μιτοχονδριακής αναπνοής (Veksler, Kuznetsov et al. 1987)

Μετά από μία ελαφρά έκπλυση σε παγωμένο διάλυμα Ringer, το δείγμα του ιστού μεταφέρθηκε σε παγωμένο διάλυμα A και παρασκευάστηκε, με τη βοήθεια αιχμηρών λαβίδων, σε λεπτά δεμάτια ινών διαμέτρου περίπου 0,3-0,4 mm. Το διάλυμα A αποτελούνταν από 10 mmol/l αιθυλογλυκόλης τετροξικού οξέος (EGTA), 3mmol/l ελεύθερου Mg^{++} , 20 mmol/l ταυρίνης, 0,5 mmol/l διθειοθρεϊτόλης, 20 mmol/l ιμιδαζόλης, 0,16 mmol/l μορφοαιθανολοσουλφονικού καλίου (pH =7,2) 0,5 mmol/l ATP (άλας μαγνησίου) και 15mmol/l φωσφοκρεατίνη (άλας νατρίου). Για να απομακρυνθεί το ενδοκυττάριο ασβέστιο, τα δεμάτια του μυ αναδεύτηκαν ελαφρώς για 2 ώρες στο διάλυμα A. Έπειτα, τα δεμάτια απογυμνώθηκαν σε διάλυμα A που περιείχε 100μg/ml σαπωνίνης. Η σαπωνίνη είναι μία γλυκοσίδη φυτικής προέλευσης που έχει υψηλή συγγένεια με τη χοληστερόλη και η οποία, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, αφαιρεί εκλεκτικά τη σαρκοπλασματική μεμβράνη των μυοκυττάρων. Η εκλεκτικότητα της σαπωνίνης οφείλεται στο ότι η σαρκοπλασματική μεμβράνη είναι πλούσια σε χοληστερόλη, ενώ οι μεμβράνες των μιτοχονδρίων περιέχουν ελάχιστη χοληστερόλη.

Η διάρκεια 20 min απογυμνωτική διαδικασία πραγματοποιήθηκε ενώ το δείγμα αναδευόταν έντονα στους 4°C. Μετά την απογύμνωση, τα δείγματα πλύθηκαν για 30 λεπτά σε διάλυμα B, για να αφαιρεθεί η σαπωνίνη και να μειωθούν οι συγκεντρώσεις των ενδοκυττάρων φωσφορικών ριζών υψηλής ενέργειας και των νικοτινο-αδένινο-νουκλεοτίδιο-εξαρτώμενων υποστρωμάτων. Το διάλυμα B αποτελούνταν από 10 mmol/l EGTA, 3mmol/l ελεύθερου Mg^{++} , 20mmol/l ταυρίνης, 0,5mmol/l διθειοθρεϊτόλης, 20 mmol/l ιμιδαζόλης, 0,16 mmol/l μορφοαιθανολοσουλφονικού καλίου (pH =7,2), 3mmol/l φωσφορικού και 10 mg/ml βοεΐας

αλβουμίνης χωρίς λιπαρά οξέα. Τα δείγματα πλύθηκαν πάλι για 30 λεπτά με φρέσκο διάλυμα B, πριν τοποθετηθούν στον οξυγραφικό θάλαμο για τον προσδιορισμό της μιτοχονδριακής αναπνοής.

Η μιτοχονδριακή απόδοση και ποιότητα των απογυμνωμένων ινών μελετήθηκε διεξοδικά από την ομάδα μας και από άλλες ομάδες. Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση των απογυμνωμένων μυϊκών δεματίων έδειξε πλήρη απομάκρυνση του κυτταροπλάσματος με διατήρηση του συνόλου των μιτοχονδρίων (Altschuld, Hohl et al. 1981; Altschuld, Wenger et al. 1985; Lin, Krockmalnic et al. 1990; Letellier, Malgat et al. 1992; Kunz, Kuznetsov et al. 1993). Επιπλέον, η ηλεκτρονική μικροσκόπηση έδειξε ότι αυτά τα παρασκευασμένα μιτοχόνδρια παραμένουν μορφολογικά ακέραια και διατηρούν φυσιολογικές επαφές με τον κυτταροσκελετό και τα άλλα ενδοκυττάρια οργανίδια (Lin, Krockmalnic et al. 1990). Επιπρόσθετα, βιοχημική ανάλυση των απογυμνωμένων μυϊκών δεματίων κατέδειξε άμεση πρόσβαση όλων των διαλυτών ουσιών στα μιτοχόνδρια, κάνοντας δυνατό τον πλήρη έλεγχο της φυσιολογίας του μιτοχονδρίου με την προσθήκη κατάλληλων ουσιών και στοιχείων της επιλογής μας (Altschuld, Hohl et al. 1981; Veksler, Kuznetsov et al. 1987; Kunz, Kuznetsov et al. 1993). Τέλος, είναι πολύ σημαντικό ότι η μιτοχονδριακή αναπνοή στις απογυμνωμένες μυϊκές ίνες είναι ποιοτικά συγκρίσιμη με την απόδοση απομονωμένων μιτοχονδρίων (Veksler, Kuznetsov et al. 1987; Vercesi, Bernardes et al. 1991; Kunz, Kuznetsov et al. 1993).

Μέτρηση της μιτοχονδριακής αναπνευστικής λειτουργίας

Τα επίπεδα της μιτοχονδριακής αναπνοής υπολογίσθηκαν με ένα ηλεκτρόδιο Clark (Yellow springs instruments, Yellow springs ,Ohio) σε οξυγραφικό θάλαμο που περιείχε 15-20 μυϊκές δεσμίδες εντός 3ml διαλύματος B στους 34°C και με συνεχή ανάδευση. Η διαλυτότητα του οξυγόνου στους 34°C ήταν 386 natoms/ml. Οι αναπνευστικές παράμετροι που μετρήθηκαν περιλαμβάνουν το βασικό αναπνευστικό ρυθμό (V_o), τον αναπνευστικό ρυθμό μετά την προσθήκη των υποστρωμάτων (0,7 mmol/l μαλικό, 1,7 mmol/l γλουταμικό), (V_{SUB}), τον αναπνευστικό ρυθμό μετά την επιπλέον προσθήκη 1mmol/l ADP (V_{ADP}), και το ρυθμό μετά την προσθήκη 0,35 mmol/l ατρακτυλοσιδίου (V_{AT}). Το ατρακτυλοσίδιο είναι αναστολέας του αντιμεταφορέα ATP-ADP, μιας μιτοχονδριακής μεμβρανικής πρωτεΐνης που εξάγει ATP στο

κυτταρόπλασμα και εισάγει ADP. Το εισαγόμενο ADP χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή επιπλέον ATP. Η αναστολή του αντιμεταφορέα ATP-ADP εμποδίζει την είσοδο του ADP στο μιτοχόνδριο, επιτρέποντας μετρήσεις αναπνοής σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις ADP.

Οι πιο σημαντικές παράμετροι αυτών των μετρήσεων είναι οι ρυθμοί V_{ADP} και V_{AT} . Η V_{ADP} αντιπροσωπεύει την κατάσταση μέγιστης μιτοχονδριακής δραστηριότητας (τρίτου επιπέδου αναπνοής), ενώ η V_{AT} αντιπροσωπεύει την κατάσταση μέγιστης αναστολής (τετάρτου επιπέδου αναπνοής). Οι μετρήσεις που έγιναν αρχικά και μετά από την προσθήκη μόνο των υποστρωμάτων (μαλικό και γλουταμικό) έχουν πολύ μικρότερη σημασία. Ειδικότερα, αρχικά οι επεξεργασμένες μυϊκές ίνες δεν έχουν κυτταρόπλασμα και επομένως έχουν ελάχιστο υπολειμματικό υπόστρωμα και ADP. Η ομοιότητα στο βασικό αναπνευστικό ρυθμό (V_o) στις δύο υπό μελέτη ομάδες δείχνει ότι η προετοιμασία του δείγματος και στις δύο ομάδες είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του κυτοσολίου και του μεγαλύτερου ποσοστού των υποστρωμάτων και ADP που περιέχονται σ' αυτό. Ο δείκτης ελέγχου της μιτοχονδριακής αναπνοής (acceptor control ratio) είναι ένας ευαίσθητος δείκτης της μιτοχονδριακής λειτουργίας, που υπολογίζεται ως ο λόγος του τρίτου επιπέδου αναπνοής (V_{ADP}) προς το τέταρτο επίπεδο αναπνοής (V_{AT}), δηλαδή ως V_{ADP}/V_{AT} . Αυτός ο λόγος είναι ένας ευαίσθητος λειτουργικός δείκτης της σύνολης μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας και αναπαριστά τη σχετική διαφορά των δύο ακραίων καταστάσεων μιτοχονδριακής λειτουργίας που υπάρχουν κατά την παρουσία και απουσία του ADP. Μετά την ολοκλήρωση όλων των μετρήσεων, ο ιστός υποβλήθηκε σε επεξεργασία για τον προσδιορισμό της ποσότητας της μη-κολλαγονούχου πρωτεΐνης, με τη μέθοδο των Lowry et al. Ο αναπνευστικός ρυθμός σε κάθε βήμα εκφράζεται ως τα νανοάτομα οξυγόνου που καταναλίσκονται ανά λεπτό από κάθε mg μη-κολλαγονούχου πρωτεΐνης.

Στατιστική ανάλυση

Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα υπολογίστηκαν για τις μεταβλητές που μας ενδιέφεραν στις 2 ομάδες. Για να βρεθεί αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στους διάφορους αναπνευστικούς ρυθμούς και στους δείκτες ελέγχου μιτοχονδριακής αναπνοής,

χρησιμοποιήθηκε στατιστική t για δύο μέσους. Για αυτήν την δοκιμή, τιμή $P < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ σταθερό σφάλμα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 3^{ης} ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα μιτοχόνδρια από σκελετικούς μυς ασθενών με ΠΑΑ έδειξαν παρόμοιο βασικό αναπνευστικό ρυθμό V_o με αυτόν των ασθενών ελέγχου. Ο V_{SUB} ήταν σημαντικά χαμηλότερος στους ασθενείς με αρτηριακή νόσο σε σύγκριση με αυτόν των ασθενών ελέγχου. Ομοίως, ο V_{ADP} παρέμεινε σημαντικά χαμηλότερος στους αρτηριακούς ασθενείς σε σύγκριση με αυτόν των ασθενών ελέγχου. Ο V_{AT} στους αρτηριακούς ασθενείς ήταν παρόμοιος με αυτόν των ασθενών ελέγχου. Μιτοχόνδρια από τους αρτηριακούς ασθενείς, έναντι αυτών των ασθενών ελέγχου, είχαν ένα σημαντικά χαμηλότερο δείκτη ελέγχου μιτοχονδριακής αναπνοής (**πίνακας 8**).

Δεν έγινε καμία προσπάθεια συσχετισμού του επιπέδου μιτοχονδριακής λειτουργίας με τις κλινικές εκδηλώσεις της περιφερικής αρτηριακής νόσου στους ασθενείς της μελέτης μας. Θεωρήθηκε ότι ένας τέτοιος συσχετισμός δε θα ήταν καρποφόρος, επειδή η ομάδα ήταν μικρή και ομοιογενής και περιείχε μόνο ασθενείς με ασθένεια πολύ προχωρημένου σταδίου (δύο ασθενείς με χωλότητα εκλυόμενη μετά από πολύ μικρή απόσταση και επτά με πόνο ηρεμίας ή ιστική απώλεια). Σε μια τέτοια ομάδα, οι διαφορές στις κλινικές εκδηλώσεις είναι πάρα πολύ μικρές για να υπάρξει συσχετισμός, ακόμη και με αποτελέσματα που επιτυγχάνονται με συμβατικές και μη επεμβατικές δοκιμασίες και αρτηριογραφία (**πίνακας 9**).

Πίνακας 8. Σύγκριση της αναπνευστικής λειτουργίας (νανοάτομα οξυγόνου/λεπτό/mg μη-κολλαγονούχας πρωτεΐνης) σε μιτοχόνδρια από ασθενείς με ΠΑΑ και φυσιολογικούς ασθενείς ελέγχου. V_0 = βασικός αναπνευστικός ρυθμός, V_{sub} = ρυθμός μετά την προσθήκη των υποστρωμάτων, V_{ADP} = ρυθμός μετά την επιπλέον προσθήκη ADP, V_{AT} = ρυθμός μετά την προσθήκη ατρακτυλοσιδίου. Ο δείκτης ελέγχου της μιτοχονδριακής αναπνοής = V_{ADP}/V_{AT} .

	ΠΑΑ	Φυσιολογικοί	Τιμή P
V_0	0,31 + 0,06	0,55 + 0,12	0,087
V_{sub}	0,43 + 0,07	0,89 + 0,20	0,038
V_{ADP}	0,69 + 0,13	1,24 + 0,20	0,029
V_{AT}	0,47 + 0,07	0,45 + 0,08	0,860
Δείκτης ελέγχου της μιτοχονδριακής αναπνοής	1,41 + 0,10	2,90 + 0,20	<0,001

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά ασθενών με ΠΑΑ. ABI= δείκτης πιέσεων σφυρών, ΑΣ= ασυμπίεστα αγγεία, V_{ADP} = αναπνευστικός ρυθμός παρουσία υποστρώματος και ADP.

Ασθενής	Ηλικία	Φύλλο	Κλινική εκδήλωση	ABI	Νόσος	Εγχείρηση	Παράγοντες κινδύνου	V_{ADP}
1	51	Γυναίκα	Ιστική απώλεια	0,3	Μηροϊγνυακή	Επαναγγείωση	3	1,10
2	76	Γυναίκα	Διαλείπουσα χολόλη	0,4	Μηροϊγνυακή	Επαναγγείωση	2	1,17
3	65	Άνδρας	Ιστική απώλεια	0,5	Μηροϊγνυακή	Επαναγγείωση	3	0,61
4	62	Άνδρας	Ιστική απώλεια	0,3	Μηροϊγνυακή και κνημιαία	Ακρωτηριασμός	3	1,33
5	75	Γυναίκα	Ιστική απώλεια	ΑΣ	Μηροϊγνυακή και κνημιαία	Ακρωτηριασμός	3	0,57
Αριστερό κάτω μέλος		Γυναίκα	Ιστική απώλεια	ΑΣ	Μηροϊγνυακή και κνημιαία	Ακρωτηριασμός	3	0,86
Δεξί κάτω μέλος								
6	63	Άνδρας	Ιστική απώλεια	0,6	Μηροϊγνυακή	Επαναγγείωση	1	0,40
7	67	Γυναίκα	Άλγος ηρεμίας	0,4	Μηροϊγνυακή και κνημιαία	Επαναγγείωση	3	0,23
8	87	Γυναίκα	Ιστική απώλεια	0,3	Μηροϊγνυακή και κνημιαία	Ακρωτηριασμός	2	0,40
9	42	Γυναίκα	Διαλείπουσα χολόλη	0,5	Μηροϊγνυακή	Επαναγγείωση	3	0,25

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 3^η ΜΕΛΕΤΗΣ

Με το τρίτο μας πείραμα, προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε περαιτέρω τη λειτουργία των μιτοχονδρίων σε χρονίως ισχαιμικούς μυς. Η μέγιστη μιτοχονδριακή αναπνευστική λειτουργία (V_{ADP}), μετά από τροφοδότηση της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων με μαλικό και γλουταμικό (υποστρώματα-δότες ηλεκτρονίων), παρουσία του ADP (τελικός αποδέκτης της ενέργειας των ηλεκτρονίων στην οξειδωτική φωσφορυλίωση), ήταν σημαντικά υψηλότερη στα φυσιολογικά από ότι στα χρονίως ισχαιμικά μιτοχόνδρια. Όταν η αναπνοή αναστάλη λόγω στέρησης του ADP από τα μιτοχόνδρια, με προσθήκη ατρακτυλοσιδίου, η λειτουργία επανήλθε σε παρόμοια επίπεδα στον ισχαιμικό μυ και στο μυ ελέγχου. Αυτή η διαφορά μεταξύ των δύο ακραίων μιτοχονδριακών επιπέδων λειτουργίας εκφράσθηκε με έναν εξαιρετικά χαμηλό δείκτη ελέγχου της μιτοχονδριακής αναπνοής σε ασθενείς με ΠΑΑ, σε σύγκριση με αυτόν των ασθενών ελέγχου. Η μειωμένη απάντηση της αναπνευστικής αλυσού σε τροφοδότηση, τόσο με υποστρώματα όσο και με ADP, αλλά και ο χαμηλός δείκτης ελέγχου μιτοχονδριακής αναπνοής, δηλώνουν σημαντική μιτοχονδριακή δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας σε χρονίως ισχαιμικούς σκελετικούς μυς. Αυτή η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να έχει δύο σημαντικές αρνητικές συνέπειες. Κατ' αρχάς, τα μιτοχόνδρια ασθενών με ΠΑΑ δεν έχουν την ικανότητα να παραγάγουν ποσά ATP ανάλογα με αυτά που παράγονται από μιτοχόνδρια φυσιολογικών σκελετικών μυών. Το γεγονός αυτό θέτει τους αρτηριακούς ασθενείς σε διπλό κίνδυνο. Όχι μόνο τα μέλη τους έχουν μειωμένη παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου, ως αποτέλεσμα των αποφραγμένων αρτηριών, αλλά και αυτό το λιγοςτό οξυγόνο και οι θρεπτικές ουσίες που φτάνουν στον μυ δεν μπορούν να «μεταφραστούν» φυσιολογικά σε ATP εξ αιτίας των παθολογικών μιτοχονδρίων. Επιπρόσθετα, τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια αποτελούν μια πηγή ανώμαλα υψηλών επιπέδων ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου, οι οποίες από μόνες τους μπορούν να βλάψουν τους μηχανισμούς που διατηρούν τη φυσιολογική κυτταρική δομή και λειτουργία. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι μια σημαντική μείωση στα ενεργειακά επίπεδα και ένα ενδεχομένως σημαντικά αυξημένο επίπεδο καταστρεπτικών ριζών οξυγόνου στους σκελετικούς μυς των ασθενών με ΠΑΑ (Lesnefsky, Moghaddas et al. 2001). Ο συνδυασμός δε των δύο αυτών παθοφυσιολογικών μηχανισμών μπορεί να παίζει σημαντικό

ρόλο στην εμφάνιση και επιδείνωση όλων των κλινικών εκδηλώσεων (χωλότητα και γάγγραινα) της περιφερικής αρτηριακής νόσου.

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η τρίτη μας μελέτη είχε ως σκοπό να καταδείξει το συσχετισμό μεταξύ της περιφερικής αρτηριακής νόσου και των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων των ανώμαλων σκελετικών μυών. Μια σχέση αιτίας-αποτελέσματος μεταξύ των δύο δε μπορεί να θεμελιωθεί από μόνη της στη βάση των δεδομένων που παρουσιάζουμε. Μια νέα μελέτη, σε ένα μοντέλο ζώου με ισχαιμικό πίσω μέλος, είναι αυτήν την περίοδο εν εξελίξει στο εργαστήριό μας και ελπίζουμε ότι θα αποσαφηνίσει το αν η αθηροσκλήρωση συγκεκριμένα ή μόνο η ισχαιμία από οποιαδήποτε άλλη νόσο είναι η αιτία αυτής της δυσλειτουργίας. Ένας άλλος πιθανός περιορισμός της μελέτης μας είναι ότι η μέση ηλικία των ασθενών μας με ΠΑΑ ήταν 65 έτη, έναντι 47 στην ομάδα ελέγχου. Αυτή η διαφορά ηλικίας θα μπορούσε να είναι σημαντική εάν η μιτοχονδριακή λειτουργία βαθμιαία έφθινε με την ηλικία. Βέβαια, μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι δεν υπάρχει καμία διαφορά στο ρυθμό V_{ADP} σε ασθενείς ηλικίας από 40 έως 90 έτη (Boffoli, Scacco et al. 1994; Boffoli, Scacco et al. 1996). Ομοίως, όταν η μιτοχονδριακή λειτουργία εξετάστηκε εκτενώς σε ένα μοντέλο γήρανσης σε επίμυ, δε βρέθηκε καμία διαφορά στους ρυθμούς V_{ADP} μεταξύ των ενήλικων και γηραιότερων ζώων (Kerner, Turkaly et al. 2001). Επομένως, είναι μάλλον απίθανο η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στους μυς με ΠΑΑ να είναι αποτέλεσμα της διαφοράς ηλικίας μεταξύ της ομάδας των αρτηριοπαθών και της ομάδας ελέγχου.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα μιτοχόνδρια σε σκελετικούς μύες ασθενών με περιφερική αρτηριακή νόσο έχουν ανώμαλη δομή, εκτεταμένες βλάβες στο DNA, ανώμαλη ενζυματική έκφραση και δραστηριότητα και υφίστανται αυξημένο οξειδωτικό στρες. Στην πρώτη μας μελέτη δείξαμε ότι τα ευρήματα αυτά συνδέονται και με παθολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων, η οποία είναι παρόμοια με αυτήν των μιτοχονδριακών μυοπαθειών (Pipinos, Shepard et al. 2000). Στη δεύτερη μελέτη δείξαμε ότι η μιτοχονδριοπάθεια αυτή είναι δυνητικά αναστρέψιμη με φαρμακοθεραπεία (Pipinos, Boska et al. 2002). Τέλος, στην τρίτη μας μελέτη διαπιστώσαμε ότι η παθολογία των μιτοχονδρίων μάλλον έγκειται σε σημαντική δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας (Pipinos, Sharov et al. 2003).

Αυτή η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να έχει δύο σημαντικές αρνητικές συνέπειες. Κατ' αρχάς, τα μιτοχόνδρια ασθενών με περιφερική αρτηριακή νόσο δεν έχουν την ικανότητα να παραγάγουν ποσά ATP ανάλογα μ' αυτά που παράγονται από μιτοχόνδρια φυσιολογικών σκελετικών μυών. Επομένως, οι αρτηριακοί ασθενείς είναι διπλά χαμένοι. Όχι μόνο τα άκρα τους έχουν μειωμένη παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου, εξ' αιτίας αποφραγμένων αρτηριών, αλλά και αυτό το λιγοστό οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες που φτάνουν στο μυ δε μπορούν να «μεταφραστούν» φυσιολογικά σε ATP εξ' αιτίας των παθολογικών μιτοχονδρίων. Δεύτερον, τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια είναι μια πηγή ανώμαλα υψηλών επιπέδων ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου, οι οποίες από μόνες τους μπορούν να βλάψουν τους μηχανισμούς που διατηρούν τη φυσιολογική κυτταρική δομή και λειτουργία. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι μια σημαντική μείωση στα ενεργειακά επίπεδα και ένα ενδεχομένως σημαντικά αυξημένο επίπεδο καταστρεπτικών ριζών οξυγόνου στους σκελετικούς μύες των ασθενών με περιφερική αρτηριακή νόσο. Ο συνδυασμός μάλιστα των δύο αυτών παθοφυσιολογικών μηχανισμών μπορεί να είναι κεντρικής σημασίας για την εμφάνιση και επιδείνωση όλων των κλινικών εκδηλώσεων (χωλότητα και γάγγραινα) της περιφερικής αρτηριακής νόσου.

Τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν παθολογική μιτοχονδριακή αναπνευστική λειτουργία στο χρονίως ισχαιμικό γαστροκνήμιο μυ. Αν και οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για αυτή την ανώμαλη

μιτοχονδριακή αναπνοή δεν είναι πλήρως κατανοητοί, οι παρατηρήσεις μας δείχνουν ότι η μειωμένη αποδοτικότητα ενός ή περισσότερων συστατικών της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι πιθανότατα ο κεντρικός υπεύθυνος μηχανισμός. Για την παραπέρα μελέτη της παθοβιολογίας αυτής της μιτοχονδριοπάθειας έχουμε αναπτύξει στο εργαστήριό μας ένα μοντέλο ισχαιμίας του οπισθίου μέλους σε ποντικό. Σε εξέλιξη βρίσκονται πειράματά μας στο εν λόγω μοντέλο που επιχειρούν να διευκρινίσουν τη δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσού. Ο στόχος των πειραμάτων συγκεκριμένα είναι ο εντοπισμός της δυσλειτουργίας σε ένα από τα συμπλέγματα της αλυσού. Παράλληλα, σε εξέλιξη βρίσκονται πειράματα στο ίδιο μοντέλο, που θα διευκρινίσουν τη λειτουργική σημασία αυτής της μιτοχονδριοπάθειας στο σκελετικό μυ. Καλύτερη κατανόηση αυτών των μηχανισμών μπορεί να επιτρέψει την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την ΠΑΑ, μέσω πρόληψης ή και θεραπείας αυτής της μιτοχονδριοπάθειας. Είναι πολύ πιθανό ότι τέτοια θεραπευτικά σχήματα θα μπορούσαν να βελτιώσουν σημαντικά τη νοσηρότητα και θνησιμότητα της περιφερικής αρτηριακής νόσου.

Η ΠΑΑ σχετίζεται με σημαντική φυσική αναπηρία και οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες. Η μιτοχονδριοπάθεια που περιγράψαμε φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά στη λειτουργική αναπηρία αυτών των ασθενών. Φαρμακευτική αντιμετώπιση της μιτοχονδριακής παθολογίας, σε συνδυασμό με χειρουργική επαναιμάτωση, θα μπορούσε κατά συνέπεια να επιφέρει σημαντική βελτίωση στη μακροπρόθεσμη έκβαση της αρτηριακής νόσου. Ακόμη πιο σημαντική βέβαια είναι η πιθανότητα η έρευνα στο συγκεκριμένο θέμα να οδηγήσει τελικά σε μια ανεξάρτητη θεραπευτική μέθοδο, ικανή να επιφέρει σημαντική βελτίωση στη λειτουργία του πάσχοντος άκρου, όταν η χειρουργική επαναιμάτωση δεν είναι δυνατή.

E. ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ABSTRACT

Μελέτες σε άλλα εργαστήρια έδειξαν ότι τα μιτοχόνδρια σε σκελετικούς μυς ασθενών με ΠΑΑ έχουν ανώμαλη δομή, εκτεταμένες βλάβες στο DNA, ανώμαλη ενζυματική έκφραση-δραστηριότητα και αυξημένο οξειδωτικό στρες. Η παρούσα διατριβή περιλαμβάνει τρεις διαδοχικές μελέτες που έχουν σαν κύριο στόχο τους τη διερεύνηση της λειτουργικής σημασίας αυτών των μιτοχονδριακών μεταβολών καθώς και της παθοβιολογίας τους. Στην πρώτη μας μελέτη δείξαμε ότι τα ευρήματα αυτά συνδέονται με παθολογική *in vivo* λειτουργία των μιτοχονδρίων, η οποία είναι παρόμοια με αυτήν των μιτοχονδριακών μυοπαθειών. Στη δεύτερη μελέτη μας, δείξαμε ότι η μιτοχονδριοπάθεια αυτή είναι δυνητικά αναστρέψιμη με φαρμακοθεραπεία. Τέλος, με την τρίτη μας μελέτη, διαπιστώσαμε ότι η παθολογία των μιτοχονδρίων μάλλον έγκειται σε σημαντική δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Αυτή η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να έχει δύο σημαντικές αρνητικές συνέπειες. Αφ' ενός, τα μιτοχόνδρια ασθενών με ΠΑΑ δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν ποσά ATP ανάλογα με αυτά που παράγονται από μιτοχόνδρια φυσιολογικών σκελετικών μυών. Επομένως, οι αρτηριακοί ασθενείς είναι διπλά ζημιωμένοι. Όχι μόνο τα μέλη τους έχουν μειωμένη παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου, εξ αιτίας αποφραγμένων αρτηριών, αλλά και αυτό το λιγοστό οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες που φτάνουν στο μυ δε μπορούν να «μεταφραστούν» φυσιολογικά σε ATP εξ αιτίας των παθολογικών μιτοχονδρίων. Αφ' ετέρου, τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια είναι μια πηγή ανώμαλα υψηλών επιπέδων ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου, οι οποίες από μόνες τους μπορούν να βλάψουν τους μηχανισμούς που διατηρούν τη φυσιολογική κυτταρική δομή και λειτουργία. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι μια σημαντική μείωση στα ενεργειακά αποθέματα και ενδεχομένως ένα σοβαρά αυξημένο επίπεδο βλαβερών ριζών οξυγόνου στους σκελετικούς μυς των ασθενών με ΠΑΑ. Ο συνδυασμός των δύο αυτών παθοφυσιολογικών μηχανισμών μπορεί να είναι κεντρικής σημασίας για την εμφάνιση και επιδείνωση όλων των κλινικών εκδηλώσεων (χωλότητα, έλκη και γάγγραινα) της περιφερικής αρτηριακής νόσου.

Η συγκεκριμένη μιτοχονδριακή ανωμαλία στην ΠΑΑ, δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί ικανοποιητικά. Παρόλο που η δυσλειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι μια ελκυστική υπόθεση που εξηγεί τις παρούσες παρατηρήσεις, θα απαιτηθεί παραπέρα μελέτη ώστε να αποδειχθεί αυτή η υπόθεση και να διαλευκανθούν όλοι οι εμπλεκόμενοι μοριακοί μηχανισμοί.

Η ΠΑΑ σχετίζεται με σημαντική φυσική αναπηρία και οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες. Η μιτοχονδριοπάθεια που περιγράψαμε φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά στη λειτουργική αναπηρία των ασθενών αυτών. Φαρμακευτική αντιμετώπιση της μιτοχονδριακής παθολογίας, παράλληλα με χειρουργική επαναιμάτωση, θα μπορούσε να επιφέρει σημαντική βελτίωση στη μακροπρόθεσμη έκβαση της αρτηριακής νόσου. Ακόμη πιο ελπιδοφόρος είναι η πιθανότητα η έρευνα αυτή να οδηγήσει τελικά σε μια ανεξάρτητη θεραπευτική μέθοδο, ικανή να επιφέρει σημαντική βελτίωση στη λειτουργία του πάσχοντος μέλους, όταν η χειρουργική επαναιμάτωση δεν είναι δυνατή.

A number of works from other laboratories have demonstrated that skeletal muscle mitochondria from patients with peripheral arterial disease have abnormal ultrastructure, extensive DNA damage, abnormal enzymatic activity, and evidence of significantly increased oxidative stress. This doctoral thesis includes three consecutive studies investigating the functional significance of these mitochondrial changes and the mechanisms underlying their pathobiology. Our first study documented that these findings from other laboratories appear to be associated with defective mitochondrial function, which is similar to the one in patients with mitochondrial myopathies. Our second study then demonstrated that this mitochondriopathy is potentially reversible with pharmacotherapy. Lastly, our third study demonstrated that these mitochondrial defects appear to be secondary to a problematic function at the level of the electron transport chain. This mitochondrial dysfunction may have two significant negative effects. First, mitochondria from patients with peripheral arterial disease are not capable to produce as much ATP as normal muscle mitochondria do. Therefore, patients with arterial disease are in double jeopardy. Not only their lower extremities receive a decreased amount of nutrients and oxygen because of the diseased arterial tree, but the decreased oxygen and nutrients that get to the

muscle cannot be normally translated to ATP because of diseased mitochondria. Second, these dysfunctional mitochondria are a constant source for abnormally high levels of reactive oxygen species. Those species can be independently detrimental to the mechanisms that maintain normal cellular structure and function. The end result is a significant drop in the energy levels and a significant increase of the detrimental reactive oxygen species in the skeletal muscles of patients with peripheral arterial disease. The combination of these two pathophysiologic mechanisms appears to be of central importance for the production and worsening of all clinical manifestations of peripheral arterial disease, including intermittent claudication and tissue loss/gangrene.

Although we have made substantial progress investigating this mitochondrial abnormality, there are still a lot of significant details in its pathophysiology that need further exploration. Our studies demonstrate that most likely the underlying mechanism for this mitochondrial dysfunction is at the level of the electron transport chain. Additional work is necessary to, not only prove this hypothesis beyond doubt, but also to further investigate and clarify all the involved molecular mechanisms.

Peripheral arterial disease is associated with a significant physical impairment and the available therapeutic options are very limited. The mitochondriopathy we have described appears to be a significant contributor to the functional handicap of these patients. Treatment of this mitochondriopathy along with surgical revascularization could result in significantly enhanced outcomes. Perhaps, even more exciting, is the possibility of an independent therapeutic modality able to produce meaningful improvement in leg function when revascularization is not an option.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γεώργιος Θωμόπουλος. Διαδικτυακός τόπος Μοριακής Βιολογίας http://www-jcb.bio.auth.gr/mor_biol/cellbiology1.htm, κατασκευή ιστοσελίδων: Άρτεμις Κώστα, Copyright 1999)
- Altschuld, R., C. Hohl, et al. (1981). "Compartmentation of K⁺ in isolated adult rat heart cells." Arch Biochem Biophys **209**(1): 175-84.
- Altschuld, R. A., W. C. Wenger, et al. (1985). "Structural and functional properties of adult rat heart myocytes lysed with digitonin." J Biol Chem **260**(26): 14325-34.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-22.
- Argov, Z. and W. J. Bank (1991). "Phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P MRS) in neuromuscular disorders." Ann Neurol **30**(1): 90-7.
- Arnold, D. L., P. M. Matthews, et al. (1984). "Metabolic recovery after exercise and the assessment of mitochondrial function in vivo in human skeletal muscle by means of 31P NMR." Magn Reson Med **1**(3): 307-15.
- Aviado, D. M. and H. R. Dettelbach (1984). "Pharmacology of pentoxifylline, a hemorrheologic agent for the treatment of intermittent claudication." Angiology **35**(7): 407-17.
- Belch, J. J., I. R. Mackay, et al. (1995). "Oxidative stress is present in atherosclerotic peripheral arterial disease and further increased by diabetes mellitus." Int Angiol **14**(4): 385-8.
- Belch, J. J., E. J. Topol, et al. (2003). "Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: a call to action." Arch Intern Med **163**(8): 884-92.
- Bhat, H. K., W. R. Hiatt, et al. (1999). "Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease." Circulation **99**(6): 807-12.
- Boffoli, D., S. C. Scacco, et al. (1996). "Ageing is associated in females with a decline in the content and activity on the b-c1 complex in skeletal muscle mitochondria." Biochim Biophys Acta **1315**(1): 66-72.
- Boffoli, D., S. C. Scacco, et al. (1994). "Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle." Biochim Biophys Acta **1226**(1): 73-82.
- Boska, M. (1994). "ATP production rates as a function of force level in the human gastrocnemius/soleus using 31P MRS." Magn Reson Med **32**(1): 1-10.
- Boska, M. D., J. A. Nelson, et al. (1999). "31P MRS studies of exercising human muscle at high temporal resolution." Magn Reson Med **41**(6): 1145-51.
- Brass, E. P. (1996). "Skeletal muscle metabolism as a target for drug therapy in peripheral arterial disease." Vasc Med **1**(1): 55-9.
- Brass, E. P. and W. R. Hiatt (2000). "Acquired skeletal muscle metabolic myopathy in atherosclerotic peripheral arterial disease." Vasc Med **5**(1): 55-9.
- Brass, E. P., H. Wang, et al. (2000). "Multiple skeletal muscle mitochondrial DNA deletions in patients with unilateral peripheral arterial disease." Vasc Med **5**(4): 225-30.
- Brevetti, G., S. Perna, et al. (1995). "Propionyl-L-carnitine in intermittent claudication: double-blind, placebo-controlled, dose titration, multicenter study." J Am Coll Cardiol **26**(6): 1411-6.
- Bylund, A. C., J. Hammarsten, et al. (1976). "Enzyme activities in skeletal muscles from patients with peripheral arterial insufficiency." Eur J Clin Invest **6**(6): 425-9.
- Chance, B. (1984). "Applications of 31P NMR to clinical biochemistry." Ann N Y Acad Sci **428**: 318-32.

- Ciuffetti, G., M. Mercuri, et al. (1991). "Use of pentoxifylline as an inhibitor of free radical generation in peripheral vascular disease. Results of a double-blind placebo-controlled study." Eur J Clin Pharmacol **41**(6): 511-5.
- Criqui, M. H., A. Fronek, et al. (1985). "The sensitivity, specificity, and predictive value of traditional clinical evaluation of peripheral arterial disease: results from noninvasive testing in a defined population." Circulation **71**(3): 516-22.
- Cronenwett, J. L., K. G. Warner, et al. (1984). "Intermittent claudication. Current results of nonoperative management." Arch Surg **119**(4): 430-6.
- Davies, K. J. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects." J Biol Chem **262**(20): 9895-901.
- Davies, K. J. and M. E. Delsignore (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure." J Biol Chem **262**(20): 9908-13.
- Dawson, D. L., B. S. Cutler, et al. (1998). "Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudication: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind trial." Circulation **98**(7): 678-86.
- Dawson, D. L., W. R. Hiatt, et al. (2002). "Peripheral arterial disease: medical care and prevention of complications." Prev Cardiol **5**(3): 119-30.
- Dormandy, J., M. Mahir, et al. (1989). "Fate of the patient with chronic leg ischaemia. A review article." J Cardiovasc Surg (Torino) **30**(1): 50-7.
- Ernst, E. (1994). "Pentoxifylline for intermittent claudication. A critical review." Angiology **45**(5): 339-45.
- Farinon, A. M., A. Marbini, et al. (1984). "Skeletal muscle and peripheral nerve changes caused by chronic arterial insufficiency--significance and clinical correlations--histological, histochemical and ultrastructural study." Clin Neuropathol **3**(6): 240-52.
- Gardner, A. W., J. S. Skinner, et al. (1992). "Prediction of claudication pain from clinical measurements obtained at rest." Med Sci Sports Exerc **24**(2): 163-70.
- Han, J., P. Thompson, et al. (1990). "Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway." J Exp Med **172**(1): 391-4.
- Hands, L. J., P. J. Bore, et al. (1986). "Muscle metabolism in patients with peripheral vascular disease investigated by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy." Clin Sci (Lond) **71**(3): 283-90.
- Hiatt, W. R., S. Hoag, et al. (1995). "Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease. The San Luis Valley Diabetes Study." Circulation **91**(5): 1472-9.
- Hiatt, W. R. and M. R. Nehler (2001). "Peripheral arterial disease." Adv Intern Med **47**: 89-110.
- Hiatt, W. R., J. G. Regensteiner, et al. (1990). "Benefit of exercise conditioning for patients with peripheral arterial disease." Circulation **81**(2): 602-9.
- Hickman, P., D. K. Harrison, et al. (1994). "Exercise in patients with intermittent claudication results in the generation of oxygen derived free radicals and endothelial damage." Adv Exp Med Biol **361**: 565-70.
- Hirsch, A. T., M. H. Criqui, et al. (2001). "Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care." Jama **286**(11): 1317-24.
- Hirsch, A. T., P. Gloviczki, et al. (2004). "Mandate for creation of a national peripheral arterial disease public awareness program: an opportunity to improve cardiovascular health." J Vasc Surg **39**(2): 474-81.

- Holloszy, J. O. (1967). "Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle." J Biol Chem **242**(9): 2278-82.
- Holloszy, J. O. and E. F. Coyle (1984). "Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences." J Appl Physiol **56**(4): 831-8.
- Hood, S. C., D. Moher, et al. (1996). "Management of intermittent claudication with pentoxifylline: meta-analysis of randomized controlled trials." Cmaj **155**(8): 1053-9.
- Hoppel, C. L., D. S. Kerr, et al. (1987). "Deficiency of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase component of complex I of mitochondrial electron transport. Fatal infantile lactic acidosis and hypermetabolism with skeletal-cardiac myopathy and encephalopathy." J Clin Invest **80**(1): 71-7.
- Imparato, A. M., G. E. Kim, et al. (1975). "Intermittent claudication: its natural course." Surgery **78**(6): 795-9.
- Jansson, E., J. Johansson, et al. (1988). "Calf muscle adaptation in intermittent claudication. Side-differences in muscle metabolic characteristics in patients with unilateral arterial disease." Clin Physiol **8**(1): 17-29.
- Jonason, T. and I. Ringqvist (1985). "Factors of prognostic importance for subsequent rest pain in patients with intermittent claudication." Acta Med Scand **218**(1): 27-33.
- Karmazyn, M. (1991). "The 1990 Merck Frosst Award. Ischemic and reperfusion injury in the heart. Cellular mechanisms and pharmacological interventions." Can J Physiol Pharmacol **69**(6): 719-30.
- Kemp, G. J., C. H. Thompson, et al. (1993). "Quantitative analysis of defects of mitochondrial oxidation during recovery from exercise." Biochem Soc Trans **21**(2): 176S.
- Kerner, J., P. J. Turkaly, et al. (2001). "Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content." Am J Physiol Endocrinol Metab **281**(5): E1054-62.
- Kunz, W. S., A. V. Kuznetsov, et al. (1993). "Mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers is stimulated by caffeine." FEBS Lett **323**(1-2): 188-90.
- Kunz, W. S., A. V. Kuznetsov, et al. (1993). "Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers." Biochim Biophys Acta **1144**(1): 46-53.
- Kuznetsov, A. V., D. Strobl, et al. (2002). "Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver." Anal Biochem **305**(2): 186-94.
- Lesnefsky, E. J., S. Moghaddas, et al. (2001). "Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure." J Mol Cell Cardiol **33**(6): 1065-89.
- Letellier, T., M. Malgat, et al. (1992). "Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers." Pediatr Res **32**(1): 17-22.
- Lin, A., G. Krockmalnic, et al. (1990). "Imaging cytoskeleton--mitochondrial membrane attachments by embedment-free electron microscopy of saponin-extracted cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8565-9.
- Lundgren, F., A. G. Dahllof, et al. (1989). "Muscle enzyme adaptation in patients with peripheral arterial insufficiency: spontaneous adaptation, effect of different treatments and consequences on walking performance." Clin Sci (Lond) **77**(5): 485-93.
- Marbini, A., F. Gemignani, et al. (1986). "Abnormal muscle mitochondria in ischemic claudication." Acta Neurol Belg **86**(5): 304-10.

- Mehta, J. L., W. W. Nichols, et al. (1988). "Neutrophils as potential participants in acute myocardial ischemia: relevance to reperfusion." J Am Coll Cardiol **11**(6): 1309-16.
- Melov, S., J. M. Shoffner, et al. (1995). "Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle." Nucleic Acids Res **23**(20): 4122-6.
- Mohler, E. R., 3rd (2003). "Peripheral arterial disease: identification and implications." Arch Intern Med **163**(19): 2306-14.
- Moon, R. B. and J. H. Richards (1973). "Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance." J Biol Chem **248**(20): 7276-8.
- Nagley, P. (1991). "Coordination of gene expression in the formation of mammalian mitochondria." Trends Genet **7**(1): 1-4.
- Neumann, F. J., W. Waas, et al. (1990). "Activation and decreased deformability of neutrophils after intermittent claudication." Circulation **82**(3): 922-9.
- Pernow, B. and S. Zetterquist (1968). "Metabolic evaluation of the leg blood flow in claudicating patients with arterial obstructions at different levels." Scand J Clin Lab Invest **21**(3): 277-87.
- Pipinos, I., A. D. Shepard, et al. (2000). "Phosphorus ³¹ nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests a mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle." J Vasc Surg **31**(5): 944-52.
- Pipinos, I. I., M. D. Boska, et al. (2002). "Pentoxifylline reverses oxidative mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle." J Surg Res **102**(2): 126-32.
- Pipinos, I. I., V. G. Sharov, et al. (2003). "Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease." J Vasc Surg **38**(4): 827-32.
- Porter, J. M., B. S. Cutler, et al. (1982). "Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients." Am Heart J **104**(1): 66-72.
- Radack, K. and R. J. Wyderski (1990). "Conservative management of intermittent claudication." Ann Intern Med **113**(2): 135-46.
- Regensteiner, J. G., M. E. Hargarten, et al. (1993). "Functional benefits of peripheral vascular bypass surgery for patients with intermittent claudication." Angiology **44**(1): 1-10.
- Rosenbloom, M. S., D. P. Flanagan, et al. (1988). "Risk factors affecting the natural history of intermittent claudication." Arch Surg **123**(7): 867-70.
- Saks, V. A., V. I. Veksler, et al. (1998). "Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo." Mol Cell Biochem **184**(1-2): 81-100.
- Sullivan, G. W., H. T. Carper, et al. (1988). "Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline." Infect Immun **56**(7): 1722-9.
- Turrens, J. F., M. Beconi, et al. (1991). "Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues." Free Radic Res Commun **12-13 Pt 2**: 681-9.
- Veksler, V. I., A. V. Kuznetsov, et al. (1987). "Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers." Biochim Biophys Acta **892**(2): 191-6.
- Vercesi, A. E., C. F. Bernardes, et al. (1991). "Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ." J Biol Chem **266**(22): 14431-4.

- Wahl, D. G., J. P. Simon, et al. (1994). "Phosphorus magnetic resonance spectroscopy: a noninvasive technique for the study of occlusive arterial leg disease and peripheral vasodilator therapy." Angiology **45**(5): 367-76.
- Wallace, D. C. (1992). "Diseases of the mitochondrial DNA." Annu Rev Biochem **61**: 1175-212.
- Wibom, R., E. Hultman, et al. (1992). "Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining." J Appl Physiol **73**(5): 2004-10.
- Widmer, L. K., A. Greensher, et al. (1964). "Occlusion of Peripheral Arteries: A Study of 6,400 Working Subjects." Circulation **30**: 836-52.
- Williams, D. M., L. Fencil, et al. (1990). "Peripheral arterial occlusive disease: P-31 MR spectroscopy of calf muscle." Radiology **175**(2): 381-5.
- Wolf, E. A., Jr., D. S. Sumner, et al. (1972). "Correlation between nutritive blood flow and pressure in limbs of patients with intermittent claudication." Surg Forum **23**(0): 238-9.
- Zatina, M. A., H. D. Berkowitz, et al. (1986). "31P nuclear magnetic resonance spectroscopy: noninvasive biochemical analysis of the ischemic extremity." J Vasc Surg **3**(3): 411-20.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δημοσιεύσεις σε περιοδικά με σύστημα κριτών

1. Boska MD, Nelson JA, Sripathi N, **Pipinos II**, Shepard AD, Welch KMA. 31P magnetic resonance spectroscopy studies of exercising human muscle at high temporal resolution. *Magnetic Resonance in Medicine* 1999; 41(6): 1145-51
2. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. 31P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. *J Vasc Surg* 2000 May; 31(5): 944 952.
3. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. 31P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. *J Vasc Surg* 2000 May; 31(5): 944 952. In the Year Book of Vascular Surgery 2002, John M. Porter Editor, Chapter 1- Basic Considerations: 73-4.
4. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. Reply to a letter regarding: 31P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. *J Vasc Surg*. 2001 May; 33(5): 1133-4.
5. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard, AD, Anagnostopoulos, PV, and Katsamouris A. Pentoxifylline Reverses Oxidative Mitochondrial Defect in Claudicating Skeletal Muscle. *J Surg Res* 2002,102: 126–132
6. **Pipinos II**, Sharov VG, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Todor A, Filis KA, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2003 Oct; 38(4): 827-32.

Ανακοινώσεις-Posters

1. Boska MD, Nelson JA, **Pipinos II**, Sripathi N. Changes in energy metabolism in 3 sequential submaximal isometric contractions of human calf muscle. Ανακοίνωση στο 5th Annual Meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Vancouver, British Columbia, April 1997 [Proc ISMRM 1997; 5:1304]
2. Bosca MD, **Pipinos II**, Shepard AD Nelson JA, Richter S. Comparison of treadmill testing of peripheral perfusion deficits and oxidative indicators determined by 31-P NMRS in peripheral vascular occlusive patients. Ανακοίνωση στο 6th Annual Meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Sidney, Australia April 18-24,1998 [Proc ISMRM 1998; 6:1793.].
3. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard AD: Pathophysiology of tissue ischemia. Ανακοίνωση Grand Rounds Presentation, November 1998. Henry Ford Hospital, Detroit, MI.
4. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Nelson J, Boska MD. 31P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. Ανακοίνωση στο Scientific Meeting of the Detroit Surgical Association, Detroit, April 1999.
5. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Nelson J, Boska MD. 31P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. Ανακοίνωση στο 46th Annual Meeting, Michigan Chapter, American College of Surgeons. Harbor Springs, MI, May 6-7, 1999. Winner of the D. Emerick Szilagyi Award for outstanding research in Vascular Surgery.
6. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Nelson J, Boska MD. 31P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. Ανακοίνωση στο 23rd Annual Meeting of the Midwestern Vascular Surgical Society, Chicago, Sept. 24-25, 1999

7. **Pipinos II**, Shepard AD, Katsamouris A, Anagnostopoulos PV, Nelson JA, Boska MD. Comparison of treadmill testing and ³¹P resonance spectroscopy in patients with peripheral arterial occlusive disease. Ανακοίνωση στο 85th Annual Clinical Congress, San Francisco, CA, Oct 10-15, 1999
8. Pipinos II, Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A. Pentoxifylline reverses primary oxidative mitochondrial defect in claudication. Προφορική Ανακοίνωση στο 33rd Annual Meeting of the Association for Academic Surgery, November 18-20, 1999, Philadelphia, PA, USA
9. **Pipinos II**. Skeletal muscle mitochondriopathy in patients with peripheral arterial disease. Future directions. Ανακοίνωση στο Educational lecture series of the Vascular Laboratory, Division of Vascular Surgery, Henry Ford Hospital, Detroit, MI, Jan 28, 2000.
10. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Nypaver TJ, Cho JS, Reddy DJ. Operative management of proximal abdominal aortic aneurysms. Ανακοίνωση στο 7th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, February 21-25, 2000. Winner of the 1st place prize awarded for clinical sciences research, March 2-5, 1999.
11. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A. Pentoxifylline reverses primary oxidative mitochondrial defect in claudication. Ανακοίνωση στο 7th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, February 21-25, 2000. Winner of the 1st place prize awarded for basic sciences research performed by a fellow, March 2-5, 1999.
12. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A. Pentoxifylline reverses primary oxidative mitochondrial defect in claudication. Ανακοίνωση στο Scientific Meeting of the Detroit Surgical Association, Detroit, April 2000. Winner 2000 Charles G. Johnson Award in recognition of outstanding research presented to the Association, May 14, 2000

13. **Pipinos II.** The mitochondriopathy of arterial occlusive disease. Παρουσίαση Grand Rounds, Department of Biophysics, Physical Chemistry and Radiologic Physics, University of Pennsylvania Philadelphia, PA, April 26, 2000.

14. **Pipinos II.** The mitochondriopathy of peripheral arterial occlusive disease. Παρουσίαση Grand Rounds, Department of Hypertension and Vascular Research, Henry Ford Hospital Detroit, MI, April 27, 2000.

16. **Pipinos II,** Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A. Pentoxifylline reverses primary oxidative mitochondrial defect in claudication. Ανακοίνωση στο 47th Annual Meeting, Michigan Chapter, American College of Surgeons. Traverse City, MI, May 4-5, 2000.

17. **Pipinos II.** Physiology of claudication. Παρουσίαση Invited lecture presented to the Roy D. McClure surgical Alumni Society. Detroit, MI, October 21, 2000.

18. **Pipinos II,** Denson T, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. Skeletal muscle mitochondrial dysfunction in patients with unilateral peripheral arterial occlusive disease. Ανακοίνωση στο 34th Annual Meeting of the Association for Academic Surgery, Tampa, FL, November 2000

19. **Pipinos II.** Bioenergetics of chronically ischemic muscle. Παρουσίαση Grand Rounds lecture. Presented to the Department of Surgery, Henry Ford Hospital, Detroit, MI, January 6, 2001

20. **Pipinos II.** Acquired mitochondriopathy in chronically ischemic skeletal muscle. Παρουσίαση invited lecture presented to the Division of Vascular Surgery, Yale University, New Haven, Connecticut, January 23, 2001

21. **Pipinos II.** Metabolic myopathy in chronically ischemic skeletal muscle. Παρουσίαση

invited Grand Rounds lecture. Presented to the Department of Surgery, University of Nebraska, Omaha, Nebraska, February 10, 2001

22. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Todor A, Sharov VG, Katsamouris A., Sabah, HN. Abnormal respiration in skeletal muscle mitochondria of patients with peripheral arterial disease. Ανακοίνωση στο “Mitochondria 2001” meeting of the Mitochondrial Medicine Society, The Mitochondrial Research Society and the United Mitochondrial Disease Foundation, San Diego, CA, March 2001

23. **Pipinos II**. Mitochondria in chronically ischemic skeletal muscle. Παρουσίαση invited lecture presented to the Division of Vascular Surgery and the Vascular Biology Center, Medical College of Georgia, Augusta, Georgia, March 19, 2001

24. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Todor A, Sharov VG, Katsamouris A, Sabbah, HN. Abnormal respiration in skeletal muscle mitochondria of patients with peripheral arterial disease. Ανακοίνωση στο Detroit Surgical Association, Detroit, MI, March 2001.

25. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Todor A, Sharov VG, Katsamouris A, Sabbah, HN. Abnormal respiration in skeletal muscle mitochondria of patients with peripheral arterial disease. Ανακοίνωση στο 50th Annual Resident Surgeons Competition of the Annual Meeting of the Michigan Chapter of the American College of Surgeons, Dearborn, MI, May 2001

26. **Pipinos II**. Ischemic skeletal muscle mitochondriopathy. Παρουσίαση Research seminar presentation. Department of Vascular Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh PA, August 26, 2003

27. **Pipinos II**. Ischemic skeletal muscle mitochondriopathy: Implications for the pathogenesis of claudication and tissue loss. Παρουσίαση Invited Basic Science Seminar in Vascular Surgery. 27th annual meeting, Midwestern vascular surgical society, Chicago, IL, September 18, 2003

28. **Pipinos II.** Treatment strategies for intermittent claudication. Παρουσίαση Creighton University vascular symposium, Omaha, NE, October 3, 2003

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: Ηρακλής Η. Πιπίνος
Ημ/νία γέννησης: 22/01/69
Τόπος: Πειραιάς, Ελλάδα
Σύζυγος: Κωστούλα Πιπίνου
Παιδιά : Μαργαρίτα (21/8/00)
 Άννα (8/8/03)
Διεύθυνση: Νικηταρά 31
 Ρόδος, 85100
 και
 Department of Surgery
 983280 Univ. of Nebraska Medical Center
 Omaha, NE 68198-3280
Τηλέφωνο σπιτιού: (001 402) 496-4561
Τηλέφωνο εργασίας: (001 402) 559-4395
Fax: (001 402) 559-6749
E-mail: ipipinos@unmc.edu

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Ιατρική σχολή: Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής
09/26/86 - 07/24/92 **Πτυχίο:** 30 Ιουλίου, 1992

Βασική έρευνα: Νοσοκομείο Henry Ford ,Τμήμα Χειρουργικής,
Αγγειοχειρουργική κλινική, Detroit, Michigan.
1) 1 Νοεμβρίου, 1993 – 30 Μαΐου, 1993
Μέντορες: C.B. Ernst, M.D. και A.D. Shepard, MD
2) 1 Ιουλίου, 1996- 30 Ιουνίου, 1997
Μέντορες: O.A. Carretero, M.D. και W.H. Beierwaltes, Ph.D.
3) 1 Ιουλίου, 1999- 30 Ιουνίου 2000
Μέντορες: Αστέριος Κατσαμούρης, M.D., H.N. Sabbah, Ph.D. και
M.D. Boska, Ph.D.

Ειδικότητα Γενικής Χειρουργικής : Νοσοκομείο Henry Ford , Τμήμα Χειρουργικής, Detroit, Michigan
1 Ιουλίου, 1993 – 30 Ιουνίου, 1999
Διευθυντής προγράμματος: F.R. Lewis, Jr, M.D.

Ειδικότητα Αγγειοχειρουργικής: Νοσοκομείο Henry Ford , Τμήμα Χειρουργικής
Αγγειοχειρουργική κλινική Detroit, Michigan
1 Ιουλίου, 1999 – 30 Ιουνίου, 2001
Διευθυντές προγράμματος: D.J. Reddy, M.D., C.B. Ernst, M.D.

**Ειδικότητα
Ενδοαγγειακής
Χειρουργικής**

Πανεπιστήμιο Stanford , Τμήμα αγγειοχειρουργικής,
Stanford, California.

1 Ιουλίου, 2001 – 30 Σεπτεμβρίου, 2001

Διευθυντής προγράμματος: C.K. Zarins, M.D.

**Μεταπτυχιακά
Μαθήματα:**

Βασική μικροχειρουργική, Σεπτ.- Νοέμ. 1993

Βιοστατιστική και επιδημιολογική έρευνα, Ιούλ.-Σεπτ. 1996

Εισαγωγή στη διδασκαλία, Ιούνιος 1997

Βασικές αρχές χειρουργικής έρευνας, Νοέμ. 1999

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗ

Ιούλιος 2001- παρόν

Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής,
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της πολιτείας της Nebraska, Τμήμα
Χειρουργικής, Αγγειοχειρουργική Κλινική, Omaha, Nebraska

Ιούλιος 2001- παρόν

Αγγειοχειρουργός, Τμήμα Χειρουργικής, Αγγειοχειρουργική
Κλινική, Νοσοκομείο Veteran's Affairs της Nebraska and Western
Iowa, Omaha, Nebraska

ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ/ΑΔΕΙΕΣ

- 1) Δίπλωμα ειδικότητας Γενικής Χειρουργικής, American Board of Surgery (Certificate # 45082, Εκδόθηκε: 11 Απριλίου, 2000, Ημ/νία λήξεως: 1 Ιουλίου, 2010)
- 2) Δίπλωμα ειδικότητας Αγγειοχειρουργικής, American Board of Vascular Surgery (Certificate 101240, Εκδόθηκε: 20 Μαΐου, 2002, Ημ/νία λήξεως: 1 Ιουλίου, 2012)
- 3) Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος στην πολιτεία της Nebraska #: 21818, Εκδόθηκε: 6/19/01, Ημ/νία λήξεως: 10/01/05
- 4) Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος στην πολιτεία της California #: A74243, Εκδόθηκε: 4/5/01, Ημ/νία λήξεως: 01/31/05
- 5) Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος στην πολιτεία του Michigan #: 4301061204, Εκδόθηκε: 8/17/98, Ημ/νία λήξεως: 01/31/05
- 6) Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος στον νομό Δωδεκανήσου, Εκδόθηκε: 8/17/98, Ημ/νία λήξεως: 01/31/05

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΙΕΣ

1994-	Ιατρικός Σύλλογος Ρόδου-Δωδ/σου
1995-	Αμερικανικό Κολλέγιο Χειρουργικής
2003-	Αμερικανική Αγγειοχειρουργική Εταιρία
2002-	Εταιρία Ακαδημαϊκής Χειρουργικής
2004-	Χειρουργική Εταιρία Νοσοκομείων Veterans Administration
1994-	Αμερικανικός Ιατρικός Σύλλογος
1994-	Χειρουργική Εταιρία Του Detroit
1999-	Χειρουργική Εταιρία Roy D. McLure

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ:

Πανεπιστήμιο της πολιτείας της Nebraska, Τμήμα Ιατρικής.

2001- τώρα Διαλέξεις Χειρουργικής για τρίτοετείς φοιτητές ιατρικής

Πανεπιστημιακό νοσοκομείο της πολιτείας της Nebraska, Εκπαιδευτικό πρόγραμμα ειδικότητας, Γενικής χειρουργικής

2001- τώρα Διαλέξεις Βασικών και κλινικών επιστημών για τους ειδικευόμενους της Γενικής Χειρουργικής.

Νοσοκομείο Henry Ford, Εκπαιδευτικό πρόγραμμα ειδικότητας, Γενικής χειρουργικής.

1999-2001 Διαλέξεις Βασικών και κλινικών επιστημών για τους ειδικευόμενους της Γενικής Χειρουργικής.

Ιατρική σχολή του Chicago / Έδρα Νοσοκομείου Henry Ford:

1996-2001 Διαλέξεις Χειρουργικής για τρίτοετείς φοιτητές ιατρικής

ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- 1) Παθοφυσιολογία της μιτοχονδριοπάθειας του χρονίως ισχαιμικού μυός (Κύριος ερευνητής).
- 2) Παναμερικανική μελέτη Open Versus Endovascular Repair for AAA, Κύριος ερευνητής για την πολιτεία της Nebraska

ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

Κλινικό έργο	1994- 1999: Ετήσιο βραβείο για υψηλή επίδοση στις ετήσιες Παναμερικανικές εξετάσεις του American Board of Surgery 1997-1998: Βραβείο του τμήματος για τη διδασκαλία φοιτητών Ιατρικής
Έρευνα	-Το βραβείο Charles C. Guthrie του έτους 1997 από την Midwestern Vascular Surgical Society, για ερευνητική δραστηριότητα στην αγγειοχειρουργική. Τίτλος εργασίας: Depressor response to sustained angiotensin II inhibition in chronic renovascular hypertension predicts success of surgical repair -Το βραβείο Charles G. Johnson του έτους 1998 από την Surgical Association του Detroit, για ερευνητική δραστηριότητα στην αγγειοχειρουργική. Τίτλος εργασίας: Depressor response to sustained angiotensin II inhibition in chronic renovascular hypertension predicts success of surgical repair -Το βραβείο D. Emerick Szilagyi του έτους 1999 από το Michigan Chapter American College of Surgeons για ερευνητική δραστηριότητα στην αγγειοχειρουργική. Τίτλος εργασίας: ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. - Το βραβείο Charles G. Johnson του έτους 2000 από την Surgical Association του Detroit, για ερευνητική δραστηριότητα στην αγγειοχειρουργική. Τίτλος εργασίας: Pentoxifylline reverses primary oxidative mitochondrial defect in claudication. -Το βραβείο Charles G. Johnston του έτους 2001 από την Surgical Association του Detroit, για ερευνητική δραστηριότητα στην αγγειοχειρουργική. Τίτλος εργασίας: Factors affecting outcome in suprarenal abdominal aortic aneurysm repair. (Κύριος ερευνητής: P.V. Anagnostopoulos). -Το βραβείο D. Emerick Szilagyi του έτους 2001 από το Michigan Chapter American College of Surgeons για ερευνητική δραστηριότητα στην αγγειοχειρουργική.

Τίτλος εργασίας: Supraceliac aortic crossclamping is associated with consumptive coagulopathy and not primary fibrinolysis (Κύριος ερευνητής: P.V. Anagnostopoulos).

Ιατρική σχολή

- 1) Αποφοίτηση: 2^{ος} στο έτος 1992 (Τελικός βαθμός αποφοίτησης 8.2/10)
- 2) Υποτροφία από το Ελληνικό κράτος για τα έτη 1990, 1991, 1992
- 3) Υποτροφία από το ιδιωτικό ίδρυμα Ρεθύμνη

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Δημοσιεύσεις σε περιοδικά με σύστημα κριτών

1. Dossa CD, **Pipinos II**, Shepard AD, Ernst CB: Primary Aortoenteric Fistula: Basic Data. Ann. Vasc. Surg. 8:113-120, 1994.
2. Dossa CD, **Pipinos II**, Shepard AD, Ernst CB: Primary Aortoesophageal Fistula: Basic Data. Ann. Vasc. Surg. 8:207-211, 1994.
3. **Pipinos II**, Reddy DJ: Secondary Aortoesophageal Fistula. J Vasc Surg 1997; 26:144-149
4. **Pipinos II**, Dossa CD, Reddy DJ: Superficial temporal artery aneurysms. J Vasc Surg 1998; 27:374-377
5. **Pipinos II**, Reddy DJ: Reply to Letter by Dr. S.A. LeMaire regarding: 'Secondary aortoesophageal fistula J Vasc Surg 1998; 27:387-8
6. **Pipinos II**, Nypaver TJ, Mohsin SK, Carretero OA and Beierwaltes WH: Response to angiotensin inhibition in rats with sustained renovascular hypertension correlates with response to removing renal artery stenosis. J Vasc Surg 1998; 28:167-77
7. Boska MD, Nelson JA, Sripathi N, **Pipinos II**, Shepard AD, Welch KMA. ³¹P magnetic resonance spectroscopy studies of exercising human muscle at high temporal resolution. Magnetic Resonance in Medicine 1999; 41(6): 1145-51
8. Bhatt M, **Pipinos II**. Hunger and intestinal ischemia. Hospital Physician 1999; 35(9): 55
9. **Pipinos II**, Reddy DJ: Secondary Aortoesophageal Fistulae. Ann Vasc Surg 1999; 13(6): 649-652
10. Gasparri MG, **Pipinos II**, Bleza DA. Spontaneous internal drainage of a pancreatic pseudocyst. J Am Coll Surg. 1999 Dec; 189(6): 625.

11. Gasparri MG, **Pipinos II**, Bleza DA, Shepard AD. Pylephlebitis secondary to intestinal ischemia. *J Am Coll Surg* 2000 Feb; 190(2): 265.
12. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. *J Vasc Surg* 2000 May; 31(5): 944-952.
13. Gasparri MG, **Pipinos II**, Kralovich KA, Margolin DA. Retrograde jejuno gastric intussusception *South Med J.* 2000 May; 93(5): 499-500.
14. Anagnostopoulos PV, **Pipinos II**, Rose WW, Elkus R. Lymphoepithelial cyst in the pancreas: A case report and review of the literature. *Dig Surg.* 2000; 17(3): 309-314.
15. **Pipinos II**, Carr JA, Haithcock BE, Anagnostopoulos PV, Dossa CD, Reddy DJ: Secondary Aortoenteric Fistula. *Ann Vasc Surg.* 2000 Nov; 14(6): 688-96.
16. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. Reply to a letter regarding ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. *J Vasc Surg.* 2001 May; 33(5): 1133-4.
17. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Raman SB, Chadry PA, Mishima T, Morita H, Suzuki G. Analysis of coagulation changes associated with supraceliac aortic crossclamping using thromboelastography. *J Surg Res.* 2001 Jun 1; 98(1): 52-8.
18. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Raman SB, Chaudhry PA, Mishima T, Morita H, Suzuki G. Hemostatic alterations associated with supraceliac aortic cross-clamping. *J Vasc Surg.* 2002 Jan; 35(1): 100-8.
19. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Nypaver TJ, Cho JS, Reddy DJ. Factors affecting outcome in suprarenal abdominal aortic aneurysm repair. *Ann Vasc Surg.* 2001 Sep; 15(5): 511-9.
20. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard, AD, Anagnostopoulos, PV, and Katsamouris A. Pentoxifylline Reverses Oxidative Mitochondrial Defect in Claudicating Skeletal Muscle. *J Surg Res* 2002,102: 126–132
21. Filis K, Arko FR, Johnson BL, **Pipinos II**, Harris EJ, Olcott C, Harris EJ, Zarins CK. Duplex ultrasound criteria for defining the severity of carotid stenosis. Duplex ultrasound criteria for defining the severity of carotid stenosis. *Ann Vasc Surg.* 2002 Jul; 16(4): 413-21
22. Lynch TG, **Pipinos II**, Boska MD. Editorial regarding "Can carotid endarterectomy improve metabolic status in patients with asymptomatic internal carotid artery flow lesion? Studies with localized in vivo proton magnetic resonance spectroscopy". *J Vasc Surg.* 2002 Sep; 36(3): 646-8

23. Guerrero A, Gibson K, Kralovich KA, **Pipinos II**, Agnostopoulos P, Carter Y, Bulger E, Meissner M, Karmy-Jones R. Limb loss following lower extremity arterial trauma: what can be done proactively? *Injury*. 2002 Nov; 33(9): 765-9.

24. **Pipinos II**, Sharov VG, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Todor A, Filis KA, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2003 Oct; 38(4): 827-32.

Κεφάλαια/Συνεισφορές σε βιβλία

1. Dossa CD, **Pipinos II**, Shepard AD, Ernst CB: Primary Aortoenteric Fistula: Part I. In Basic Data Underlying Clinical Decision Making in Vascular Surgery. Eds. Porter JM, Taylor LM. Quality Medical Publishing, Inc., St Louis, MO, 116-123, 1994.

2. Dossa CD, **Pipinos II**, Shepard AD, Ernst CB: Primary Aortoesophageal Fistula: Part II. In Basic Data Underlying Clinical Decision Making In Vascular Surgery. Eds. Porter JM, Taylor LM. Quality Medical Publishing, Inc., St Louis, MO, 124-128, 1994.

3. **Pipinos II**: Sections on: 1) Primary Aortoesophageal fistulae and 2) Secondary Aortoesophageal fistulae. In Self Assessment in Cardiothoracic Critical Care. Eds. Karmy-Jones R, Hamilton A, Rubens F., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1998.

4. **Pipinos II**, Shepard AD: Sections on: 1) Management of Acute Stroke following Carotid Endarterectomy, 2) Reperfusion associated Compartment Syndrome and Myonecrosis, 3) Nonocclusive Mesenteric Ischemia, 4) Tracheoinnominate fistula, 5) Management of puncture site complications resulting from percutaneous arterial interventions. In Self Assessment Color Review in General Critical Care. Eds. Horst H. M., Karmy-Jones R., Manson Publishing London, UK, 2001

5. **Pipinos II**, Escobar FS, Anagnostopoulos PV, Elliott JP, Schwartz SA. Early experience with Taylor and Notched vein patching in the construction of arteriovenous hemodialysis access procedures: Results of a prospective study. In: Henry ML, Ferguson RM (Eds). Vascular Access for Hemodialysis VI. Chicago: WL Gore & Associates, Inc. & Precept Press, 1999.

6. Reddy DJ, **Pipinos II**, Shepard AD. Aortoiliac arterial occlusive disease. In Greenfield LJ, Mulholland MW, Oldham KT, Zelenock GB (Eds). *Surgery: Scientific Principles and Practice*, JB Lippincott Company, Philadelphia. 3rd edition.

7. Reddy DJ, **Pipinos II**, Shepard AD. Aortoiliac arterial occlusive disease. In Greenfield LJ, Mulholland MW, Oldham KT, Zelenock Gb (eds). *Review for Surgery: Scientific Principles and Practice*, JB Lippincott Company, Philadelphia. 3rd edition.

8. Morris DE, Escobar FS, Anagnostopoulos PV, **Pipinos II**, Schwartz SA. Venovenous bypass for central vein occlusions-Long term results. In: Henry ML, Ferguson RM (Eds). Vascular Access for Hemodialysis VII. Chicago: WL Gore & Associates, Inc. & Precept Press, (In Press).

Επιστημονικές ανακοινώσεις, στρογγυλές τράπεζες, προσκλήσεις σε ομιλίες

1. Escobar FS, **Pipinos II**: Vascular access. Παρουσίαση σε Grand Rounds, May 1995. Henry Ford Hospital, Detroit, MI.
2. **Pipinos II**, Escobar FS, Elliott JP, Schwartz SA, Abouljoud MS: Sutureless construction of vascular anastomoses in hemodialysis access procedures. Ανακοίνωση στο Scientific Exhibit Session of the American College of Surgeons 82nd annual clinical congress, San Francisco, California. October 6-11, 1996.
3. **Pipinos II**, Escobar FS: From Androsov to modern vascular techniques. Παρουσίαση σε Grand Rounds November 1996. Henry Ford Hospital, Detroit, MI.
4. **Pipinos II**, Escobar FS, Elliott JP, Schwartz SA, Abouljoud MS: Sutureless construction of vascular anastomoses in hemodialysis access procedures. Ανακοίνωση στο Scientific Exhibit Session of the Henry Ford Hospital Resident Research Forum, Detroit, Michigan. February 25-27, 1997.
5. **Pipinos II**, Escobar FS, Elliott JP, Schwartz SA, Abouljoud MS: Sutureless construction of vascular anastomoses in hemodialysis access procedures. Ανακοίνωση στο Michigan Vascular Surgical Association Meeting, Novi, Michigan. April 13, 1997.
6. **Pipinos II**, Nypaver TJ, Mohsin SK, Carretero OA and Beierwaltes WH: Depressor response to sustained angiotensin-II inhibition in chronic renovascular hypertension predicts success of surgical repair. Ανακοίνωση στο 33rd Annual Meeting of the Michigan Society of Thoracic and Cardiovascular Surgeons, Gaylord, Michigan, August 1, 1997
7. Anagnostopoulos PV, Escobar FS, **Pipinos II**, Elliott JP, Schwartz SA: New techniques for the construction of graft to vein anastomoses in arteriovenous dialysis access procedures. Ανακοίνωση στο Scientific Exhibit Session at the ACS 83rd Annual Clinical Congress, Chicago, Illinois, April 10, 1997.
8. **Pipinos II**, Nypaver TJ, Mohsin SK, Carretero OA and Beierwaltes WH: Depressor response to sustained angiotensin-II inhibition in chronic renovascular hypertension predicts success of surgical repair. Ανακοίνωση στο 21st Annual Scientific Meeting of the Midwestern Vascular Surgical Society, Chicago September 1997, Winner 1997 **Charles C. Guthrie Award** for outstanding research in Vascular Surgery.
9. **Pipinos II**, Escobar FS, Anagnostopoulos PV, Elliott JP, Schwartz SA. Early experience with Taylor and Notched vein patching in the construction of arteriovenous hemodialysis access

procedures: Results of a prospective study. Ανακοίνωση στο Roy D. McLure Surgical Alumni Society Triennial Scientific Meeting, September 1997.

10. **Pipinos II**, Nypaver TJ, Mohsin SK, Carretero OA and Beierwaltes WH: Depressor response to sustained angiotensin-II inhibition in chronic renovascular hypertension predicts success of surgical repair. Ανακοίνωση στο Scientific Meeting of the Detroit Surgical Association, Detroit, October 1997. Winner 1998 **Charles G. Johnson Award** in recognition of outstanding research presented to the Association, May 14, 1998

11. **Pipinos II**, Nypaver TJ, Mohsin SK, Carretero OA and Beierwaltes WH: Depressor response to sustained angiotensin-II inhibition in chronic renovascular hypertension predicts success of surgical repair. Ανακοίνωση στο 5th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, February 1998. Winner of the **1st place prize** awarded for basic sciences research, February 24-26, 1998.

12. Boska MD, Nelson JA, **Pipinos II**, Sripathi N. Changes in energy metabolism in 3 sequential submaximal isometric contractions of human calf muscle. Ανακοίνωση στο 5th Annual Meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Vancouver, British Columbia, April 1997 [Proc ISMRM 1997; 5:1304]

13. Bosca MD, **Pipinos II**, Shepard AD Nelson JA, Richter S. Comparison of treadmill testing of peripheral perfusion deficits and oxidative indicators determined by ^{31}P NMRS in peripheral vascular occlusive patients. Ανακοίνωση στο 6th Annual Meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Sidney, Australia, April 18-24, 1998 [Proc ISMRM 1998; 6:1793.].

14. **Pipinos II**, Escobar FS, Anagnostopoulos PV, Elliott JP, Schwartz SA. Early experience with Taylor and Notched vein patching in the construction of arteriovenous hemodialysis access procedures: Results of a prospective study. Ανακοίνωση στο 6th National Meeting for Hemodialysis Access, Miami, May 1998.

15. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Kiskinis D, Boska MD. ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy: in vivo, real time, noninvasive study of the ischemic limb bioenergetics. Ανακοίνωση στο Scientific Exhibit Session at the ACS 84th Annual Clinical Congress, Orlando, Florida, October 25-30, 1998.

16. Anagnostopoulos PV, Escobar FS, **Pipinos II**, Elliott JP, Schwartz SA. Bypass of subclavian vein occlusion for the salvage of hemodialysis access grafts and fistulae. Ανακοίνωση στο Scientific Exhibit Session at the ACS 84th Annual Clinical Congress, Orlando, Florida, October 25-30, 1998.

17. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard AD: Pathophysiology of tissue ischemia. Παρουσίαση σε Grand Rounds, November 1998. Henry Ford Hospital, Detroit, MI.

18. Gasparri MG, **Pipinos II**, Kralovich KA, Patton J, Obeid FN. Thoracic outlet trauma. Παρουσίαση σε Grand Rounds, February 1999. Henry Ford Hospital, Detroit, MI.
19. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Boska MD. ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy: in vivo, real time, noninvasive study of the ischemic limb bioenergetics. Ανακοίνωση στο 6th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, March 1999.
20. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Nelson J, Boska MD ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{31}P NMRS) reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria (DM) in claudicating muscle. Ανακοίνωση στο 6th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, March 1999.
21. Gasparri MG, **Pipinos II**, Kralovich KA, Patton J, Obeid FN. Angiography in the Management of Penetrating Periclavicular Trauma. Ανακοίνωση στο 6th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, March 1999.
22. Shah NL, **Pipinos II**, Malik M, Anagnostopoulos PV, Nypaver TJ. Neovascular glaucoma: A rare complication of carotid revascularization. Ανακοίνωση στο 6th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, March 1999.
23. Anagnostopoulos PV, Escobar FS, **Pipinos II**, Elliott JP, Schwartz SA. Bypass of subclavian vein occlusion for the salvage of hemodialysis access grafts and fistulae. Ανακοίνωση στο 6th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, March 1999.
24. Gasparri MG, **Pipinos II**, Kralovich KA, Margolin DA. Retrograde jejuno gastric intussusception. Ανακοίνωση στο 6th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, March 1999. Winner of the **2nd place prize** awarded for clinical sciences research, March 2-5, 1999.
25. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Nelson J, Boska MD. ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. Ανακοίνωση στο Scientific Meeting of the Detroit Surgical Association, Detroit, April 1999.
26. Lorelli D, Gasparri MG, **Pipinos II**, Kralovich KA, Patton J, Obeid FN. Angiography in the Management of Penetrating Periclavicular Trauma. Ανακοίνωση στο Scientific Meeting of the Detroit Surgical Association, Detroit, April 1999.
27. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Nelson J, Boska MD. ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. Ανακοίνωση στο 46th Annual Meeting, Michigan Chapter, American College of Surgeons. Harbor Springs, MI, May 6-7, 1999. Winner of the **D. Emerick Szilagyi Award** for outstanding research in Vascular Surgery.

28. **Pipinos II**, Escobar FS, Anagnostopoulos PV, Elliott JP, Schwartz SA. Early experience with Taylor and Notched vein patching in the construction of arteriovenous hemodialysis access procedures: Results of a prospective study. Ανακοίνωση στο 46th Annual Meeting, Michigan Chapter, American College of Surgeons. Harbor Springs, MI, May 6-7, 1999.
29. Lorelli D, Gasparri MG, **Pipinos II**, Kralovich KA, Patton J, Obeid FN. Angiography in the Management of Penetrating Periclavicular Trauma. Ανακοίνωση στο 46th Annual Meeting, Michigan Chapter, American College of Surgeons. Harbor Springs, MI, May 6-7, 1999.
30. **Pipinos II**. Renovascular hypertension. Ανακοίνωση στο Divisional Grand Rounds of the Division of Vascular Surgery, Henry Ford Hospital, Detroit, MI, May 27, 1999.
31. Gasparri MG, Kralovich KA, **Pipinos II**, Lorelli D, Obeid FN. Physical examination plus chest radiography in Penetrating Periclavicular Trauma: the appropriate trigger for angiography. Ανακοίνωση στο 59th annual meeting of the American Association for the Surgery of Trauma, Boston, MA, September 16-18, 1999.
32. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Nelson J, Boska MD. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. Ανακοίνωση στο 23rd Annual Meeting of the Midwestern Vascular Surgical Society, Chicago, Sept. 24-25, 1999
33. **Pipinos II**, Shepard AD, Katsamouris A, Anagnostopoulos PV, Nelson JA, Boska MD. Comparison of treadmill testing and 31P resonance spectroscopy in patients with peripheral arterial occlusive disease. Ανακοίνωση στο 85th Annual Clinical Congress, San Francisco, CA, Oct 10-15, 1999
34. **Pipinos II**, Escobar FS, Anagnostopoulos PV, Elliott JP, Schwartz SA. Early experience with Taylor and Notched vein patching in the construction of arteriovenous hemodialysis access procedures: Results of a prospective study. Ανακοίνωση στο Scientific Meeting of the Detroit Surgical Association, Detroit, Oct 24, 1999.
35. **Pipinos II**. Embryology of arteries and veins. Ανακοίνωση στο Divisional Grand Rounds of the Division of Vascular Surgery, Henry Ford Hospital, Detroit, MI, Oct 28, 1999.
36. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A. Pentoxifylline reverses primary oxidative mitochondrial defect in claudication. Oral presentation at the 33rd Annual Meeting of the Association for Academic Surgery, November 18-20, 1999, Philadelphia, PA, USA
37. **Pipinos II**. Skeletal muscle mitochondriopathy in patients with peripheral arterial disease. Future directions. Ανακοίνωση στο Educational lecture series of the Vascular Laboratory, Division of Vascular Surgery, Henry Ford Hospital, Detroit, MI, Jan 28, 2000.

38. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Nypaver TJ, Cho JS, Reddy DJ. Operative management of proximal abdominal aortic aneurysms. Ανακοίνωση στο 7th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, February 21-25, 2000. Winner of the **1st place prize** awarded for clinical sciences research, March 2-5, 1999.
39. Schuerer D, **Pipinos II**, Nypaver TJ, Reddy DJ. Enlarging abdominal aortic aneurysm from an endoleak requiring partial graft explant and repair. Ανακοίνωση στο 7th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, February 21-25, 2000.
40. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A. Pentoxifylline reverses primary oxidative mitochondrial defect in claudication. Ανακοίνωση στο 7th Annual Resident and Fellow research Forum, Henry Ford Hospital, February 21-25, 2000. Winner of the **1st place prize** awarded for basic sciences research performed by a fellow, March 2-5, 1999.
41. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A. Pentoxifylline reverses primary oxidative mitochondrial defect in claudication. Ανακοίνωση στο Scientific Meeting of the Detroit Surgical Association, Detroit, April 2000. Winner **2000 Charles G. Johnson Award** in recognition of outstanding research presented to the Association, May 14, 2000
42. **Pipinos II**. The mitochondriopathy of arterial occlusive disease. Παρουσίαση σε Grand Rounds, Department of Biophysics, Physical Chemistry and Radiologic Physics, University of Pennsylvania Philadelphia, PA, April 26, 2000.
43. **Pipinos II**. The mitochondriopathy of peripheral arterial occlusive disease. Παρουσίαση σε Grand Rounds, Department of Hypertension and Vascular Research, Henry Ford Hospital Detroit, MI, April 27, 2000.
44. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Nypaver TJ, Cho JS, Reddy DJ. Operative management of proximal abdominal aortic aneurysms. Ανακοίνωση στο 47th Annual Meeting, Michigan Chapter, American College of Surgeons. Traverse City, MI, May 4-5, 2000.
45. **Pipinos II**, Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A. Pentoxifylline reverses primary oxidative mitochondrial defect in claudication. Ανακοίνωση στο 47th Annual Meeting, Michigan Chapter, American College of Surgeons. Traverse City, MI, May 4-5, 2000.
46. Morris DE, Escobar FS, Anagnostopoulos PV, **Pipinos II**, Schwartz SA. Venovenous bypass for ceentral vein occlusions-Long term results. Ανακοίνωση στο 7th National Meeting for Hemodialysis Access, Miami, May 2000.
47. Anagnostopoulos PV, Morris DE, Escobar FS, **Pipinos II**, Schwartz SA, Abouljoud M. Hemodialysis access after exaustion of conventional arm sites: The exotic grafts. Poster ανακοίνωση στο 54th Annual Meeting of the Society for Vascular Surgery, Toronto, Ontario, Canada, June 11-14, 2000.

48. **Pipinos II**. Physiology of claudication. Invited lecture ανακοίνωση στο the Roy D. McClure surgical Alumni Society. Detroit, MI, October 21, 2000.
49. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Chaudry PA, Raman SBK, Mishima T, Morita H. Supraceliac aortic crossclamping is associated with consumptive coagulopathy and not primary fibrinolysis. Ανακοίνωση στο 24th Annual Meeting of the Midwestern Vascular Surgical Society, Scottsdale, Arizona AZ, November 5-8, 2000
50. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Chaudry PA, Raman SBK, Mishima T, Morita H. Analysis of coagulation changes associated with supraceliac aortic crossclamping using thromboelastography. Ανακοίνωση στο 34rd Annual Meeting of the Association for Academic Surgery, November 1-4, 2000, Tampa, FL
51. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Nypaver TJ, Cho JS, Reddy DJ. Factors affecting outcome in suprarenal abdominal aortic aneurysm repair. Ανακοίνωση στο Annual Meeting of the Western Surgical Association, November 12-15, 2000, Dana Point, CA.
52. **Pipinos II**, Denson T, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. Skeletal muscle mitochondrial dysfunction in patients with unilateral peripheral arterial occlusive disease (Presented at the 34th Annual Meeting of the Association for Academic Surgery, Tampa, FL, November 2000)
53. **Anagnostopoulos PV**, Shepard AD, **Pipinos II**, Raman SBK, Chaudhry PA, Mishima T. Supraceliac aortic crossclamping is associated with consumptive coagulopathy and not primary fibrinolysis. Oral ανακοίνωση στο 2000 Meeting of the Midwestern Vascular Society, Scottsdale, AZ, November 2000.
54. **Anagnostopoulos PV**, Shepard AD, **Pipinos II**, Nypaver TJ, Cho JS, Reddy DJ. Factors affecting outcome in suprarenal abdominal aortic aneurysm repair. Oral ανακοίνωση στο 2000 Meeting of the Western Surgical Association, Laguna Niguel, CA, November 2000
55. **Anagnostopoulos PV**, Shepard AD, **Pipinos II**, Nypaver TJ, Cho JS, Reddy DJ. Factors affecting outcome in suprarenal abdominal aortic aneurysm repair. Oral ανακοίνωση στο Detroit Surgical Association, Detroit, MI, December 2000
56. **Pipinos II**. Bioenergetics of chronically ischemic muscle. Invited Grand Rounds lecture. Ανακοίνωση στο Department of Surgery, Henry Ford Hospital, Detroit, MI, January 6, 2001
57. **Pipinos II**. Acquired mitochondriopathy in chronically ischemic skeletal muscle. Invited lecture ανακοίνωση στο Division of Vascular Surgery, Yale University, New Haven, Connecticut, January 23, 2001
58. **Pipinos II**. Metabolic myopathy in chronically ischemic skeletal muscle. Ομιλία μετά από πρόσκληση στο Department of Surgery, University of Nebraska, Omaha, Nebraska, February 10, 2001

59. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Todor A, Sharov VG, Katsamouris A., Sabah, HN. Abnormal respiration in skeletal muscle mitochondria of patients with peripheral arterial disease. Ανακοίνωση στο “Mitochondria 2001” meeting of the Mitochondrial Medicine Society, The Mitochondrial Research Society, and the United Mitochondrial Disease Foundation, San Diego, CA, March 2001
60. **Pipinos II**. Mitochondria in chronically ischemic skeletal muscle. Ομιλία μετά από πρόσκληση στο Division of Vascular Surgery and the Vascular Biology Center, Medical College of Georgia, Augusta, Georgia, March 19, 2001
61. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Raman SBK, Chaudhry PA, Mishima T. Supraceliac aortic crossclamping is associated with consumptive coagulopathy and not primary fibrinolysis. Ανακοίνωση στο Detroit Surgical Association, Detroit, MI, March 2001. Winner 2000 Charles G. Johnson Award in recognition of outstanding research presented to the Association.
62. Anagnostopoulos PV, Shepard AD, **Pipinos II**, Raman SBK, Chaudhry PA, Mishima T. Supraceliac aortic crossclamping is associated with consumptive coagulopathy and not primary fibrinolysis. Ανακοίνωση στο 50th Annual Resident Surgeons Competition of the Annual Meeting of the Michigan Chapter of the American College of Surgeons, Dearborn, MI, May 2001. Winner of the D. Emerick Szilagyi Award for outstanding research in Vascular Surgery
63. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Todor A, Sharov VG, Katsamouris A, Sabah, HN. Abnormal respiration in skeletal muscle mitochondria of patients with peripheral arterial disease. Ανακοίνωση στο Detroit Surgical Association, Detroit, MI, March 2001.
64. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Todor A, Sharov VG, Katsamouris A, Sabah, HN. Abnormal respiration in skeletal muscle mitochondria of patients with peripheral arterial disease. Ανακοίνωση στο 50th Annual Resident Surgeons Competition of the Annual Meeting of the Michigan Chapter of the American College of Surgeons, Dearborn, MI, May 2001
65. Panduranghi K, Anagnostopoulos PV, **Pipinos II**. Coagulation activation activation after supraceliac aortic crossclamping is not due to cytokine release. Ανακοίνωση στο 35th Annual Meeting of the Association for Academic Surgery, November 15-17, 2001, Milwaukee, Wisconsin
66. **Pipinos II**, Sharov VG, Todor A, Anagnostopoulos PV, Sabah HN, Shepard AD. Abnormal respiration in skeletal muscle mitochondria of patients with peripheral arterial disease. Ανακοίνωση στο 35th Annual Meeting of the Association for Academic Surgery, November 15-17, 2001, Milwaukee, Wisconsin

67. Filis K, Arko FR, Johnson BL, **Pipinos II**, Harris EJ, Olcott C, Harris EJ, Zarins CK. Duplex ultrasound criteria for defining the severity of carotid stenosis. Ανακοίνωση στο 20th World Congress of the International Union of Angiology April 7-11, 2002, New York
68. **Pipinos II**. Thoracoabdominal aneurysms. Παρουσίαση σε Grand Rounds. Department of Surgery, University of Nebraska School of Medicine, Omaha, NE September 13, 2002
68. **Pipinos II**. Thoracoabdominal aneurysms. Παρουσίαση σε Grand Rounds. Department of Medicine, University of Nebraska School of Medicine, Omaha, NE, October 25, 2002
69. **Pipinos II**, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. 31P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy reveals evidence for a primary dysfunction of mitochondria in claudicating muscle. J Vasc Surg 2000 May; 31(5): 944-952. In the Year Book of Vascular Surgery 2002, John M. Porter Editor, Chapter 1- Basic Considerations: 73-4.
70. P. Cluff, P. Vang, J.M. Johanning, J Brunz, S.A. Swanson, C.L. Hoppel, A.Katsamouris, B.T. Baxter, T.G. Lynch, **I. I. Pipinos**. Long term effects of ischemia on mouse gastrocnemius mass and mitochondrial function. Oral παρουσίαση στο Midwest student Biomedical Research Forum, Omaha, NE, February 2003.
71. J Brunz, J.M. Johanning, P. Vang, S.A. Swanson, T.G. Lynch, J. Park, C.L. Hoppel, A.Katsamouris, B.T. Baxter, **I. I. Pipinos**. Effect of long term ischemia on mouse gastrocnemius mitochondrial physiology. Oral παρουσίαση στο 27th Association of VA Surgeons, Annual Surgical Symposium, Nashville, TN, May 3-5, 2003.
72. P. Vang, J.M. Johanning, J M Brunz, S.A. Swanson, T.G. Lynch, J. Park, C.L. Hoppel, A.Katsamouris, B.T. Baxter, **I. I. Pipinos**. Effect of long term ischemia on mouse gastrocnemius mass and mitochondrial function. Poster παρουσίαση στο Mitochondria 2003 annual meeting, San Diego, CA, June 11-14, 2003.
73. **Pipinos II**. Ischemic skeletal muscle mitochondriopathy. Research seminar παρουσίαση. Department of Vascular Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh PA, August 26, 2003
74. **Pipinos II**. Ischemic skeletal muscle mitochondriopathy: Implications for the pathogenesis of claudication and tissue loss. Invited Basic Science Seminar in Vascular Surgery. 27th annual meeting, Midwestern vascular surgical society, Chicago, IL, September 18, 2003
75. **Pipinos II**. Strategies for enhanced patient participation in large trials. OVER trial 1st Annual Meeting. Cleveland, OH, September 30, 2003
76. **Pipinos II**. Treatment strategies for intermittent claudication. Creighton University vascular symposium, Omaha, NE, October 3, 2003

77. Vang P, Brunz JT, Johanning JM, Swanson SA, Zhu Z, Lynch TG, Baxter BT, **Pipinos II**. Increased muscle mass and mitochondrial content in chronically ischemic skeletal muscle. Oral poster ανακοίνωση στο 2003 Annual meeting of the Association for Academic Surgery, Sacramento, CA, November 13-15, 2003 (abstract at J Surg Res. 2003 Oct; 114(2): 299.)

78. **Pipinos II**. Ischemic skeletal muscle mitochondriopathy: Implications for the pathogenesis of claudication and tissue loss. Παρουσίαση σε Grand Rounds. Department of Surgery, University of Nebraska School of Medicine, Omaha, NE January 14, 2004

79. **Pipinos II**. Treatment strategies for intermittent claudication. Παρουσίαση σε Grand Rounds. Department of Family Medicine, University of Nebraska School of Medicine, Omaha, NE February 4, 2004

80. P. Vang, J.M. Johanning, J M Brunz, S.A. Swanson, T.G. Lynch, B.T. Baxter, **Pipinos II**. Effect of long term ischemia on mouse gastrocnemius mass and mitochondrial function. Poster ανακοίνωση στο Society for University Surgeons 65th Annual meeting. St. Louis, Missouri, February 11-14, 2004

5/22/04