



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
Χειρουργική Κλινική  
Καρδιάς-Αγγείων-Θώρακα  
Διευθυντής: Καθηγητής **Νικόλαος Β.  
Τσιλιμίκας**



---

**ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΟΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΩΝ  
ΘΕΠΙΚΗ ΧΟΝΔΡΟΪΤΙΝΗ-ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ  
ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ**

**Καραγγέλης Δήμος  
Ιατρός**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ  
2010**

[1]

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**  
**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**  
**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΛΙΖΟΣ**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Τσιλιμίγκας Νικόλαος, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ-(Επιβλέπων)

Τρυποσκιάδης Φίλιππος, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

Καραμάνος Νικόλαος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστήμιο Πατρών

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Τσιλιμίγκας Νικόλαος, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ-(Επιβλέπων)

Τρυποσκιάδης Φίλιππος, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

Καραμάνος Νικόλαος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστήμιο Πατρών

Σκουλαρίγκης Ιωάννης, Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

Ζιντζαράς Ηλίας, Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

Νταϊλιάννα Ζωή, Επικ. Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

Αηδονίδης Ισαάκ, Επικ. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

---

*‘Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.’*

*(Νόμος 5343/32, άρθρο 202 §2 και 1268/82, άρθρο 50)*

Στους γονείς μου,

Στον αδελφό μου,

Στη Μαρία,

Στο Γιώργο,

## Περιεχόμενα

Πρόλογος-Ευχαριστίες.....	6
Εισαγωγή.....	7
Γενικό μέρος.....	9
Κεφάλαιο 1. Αθηροσκλήρωση και Στεφανιαία Νόσος.....	9
Αθηροσκλήρωση.....	9
Κλινικές εκδηλώσεις αθηροσκλήρωσης.....	12
Παράγοντες κίνδυνου αθηροσκλήρωσης-Μέτρα αντιμετώπισης.....	12
Στεφανιαία Νόσος.....	15
Επιδημιολογικά δεδομένα.....	15
Αιτιολογία- προδιαθεσικοί παράγοντες.....	16
Κλινικές μορφές.....	16
Διάγνωση.....	17
Θεραπεία.....	17
Φαρμακευτική θεραπεία.....	18
Αγγειοπλαστική.....;	19
Εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης.....	20
Ενδείξεις.....	21
Εξωσωματική κυκλοφορία.....	22
Κεφάλαιο 2. Γλυκοζαμινογλυκάνες και αθηροσκλήρωση.....	26
Γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs).....	27
Χαρακτηριστικά και εντοπισμός των GAGs.....	27
Ο ρόλος των GAGs στην αθηροσκλήρωση.....	29
Προσδιορισμός των GAG με ηλεκτροφόρηση.....	41
Προσδιορισμός των δισακχαριτών θειϊκής χονδροϊτίνης (CS).....	43
Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE).....	46
Τύποι CE και εφαρμογές τους.....	51
Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE).....	52
Ανάλυση γλυκοζαμινογλυκανών με CZE.....	54
HPCE μέθοδοι-Προσδιορισμός δισακχαριτών CS.....	55
Ειδικό μέρος.....	57
Σκοπός.....	57
Υλικό και Μέθοδοι.....	57
Αποτελέσματα.....	63
Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	68
Περίληψη.....	71
Summary.....	74
Βιβλιογραφία.....	79

## Πρόλογος

Η βουτιά στα βαθιά νερά της Καρδιοχειρουργικής απαιτεί σκληρή μελέτη, επιμονή και υπομονή, μα πάνω από όλα συμπαραστάτες που να κατέχουν άριστα το αντικείμενο. Όταν η ύψιστη αυτή χειρουργική ειδικότητα απλώνει το χέρι της συνεργασίας και σε άλλους κλάδους της ιατρικής επιστήμης και της βασικής έρευνας, και αρωγοί της συνεργασίας αυτής αποτελούν διακεκριμένοι καθηγητές με τεράστια εμπειρία και βαθύτατη κατάρτιση στο γνωστικό τους αντικείμενο, τότε η προσπάθεια είναι καταδικασμένη να τελεσφορήσει.

Αισθάνομαι βαθύτατα την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά τον άνθρωπο που με μύησε στην Καρδιοχειρουργική τέχνη και επιστήμη, Καθηγητή και επιβλέποντα της διατριβής, κ. Νικόλαο ΤΣΙΑΛΙΜΙΓΚΑ, ο οποίος περιέβαλε από την πρώτη στιγμή αυτή την προσπάθεια με ιδιαίτερο ενδιαφέρον και παρείχε κάθε δυνατό μέσο για την υλοποίηση της. Θεωρώ τον εαυτό μου ιδιαίτερα ευτυχή που βρέθηκα στο ίδιο χειρουργικό τραπέζι με ένα τέτοιο άριστο χειρουργό και προπάντων ενάρετο και εύστροφο άνθρωπο, του οποίου η χειρουργική κατάρτιση έχει σφυρηλατηθεί μέσα από αναρίθμητες ώρες χειρουργικής πράξης.

Ευχαριστίες οφείλω και στον Καθηγητή Καρδιολογίας κ.Φίλιππο ΤΡΥΠΟΣΚΙΑΔΗ για την πρόσβαση στο δείγμα ασθενών της κλινικής του και για τις πολύτιμες επισημάνσεις του που ήταν πάντοτε καίριες και εποικοδομητικές.

Όσον αφορά στον τρίτο επιβλέποντα καθηγητή κ. Νικόλαο ΚΑΡΑΜΑΝΟ, οφείλω να ομολογήσω ότι παρόλο που η χιλιομετρική απόσταση που μας χώριζε όντας ο ίδιος Καθηγητής Βιοχημείας και Πρόεδρος του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών, υπήρξε σημαντική, ήταν πάντα αρωγός στην προσπάθειά μου, βοηθώντας με τις χρήσιμες συμβουλές του στο σχεδιασμό και την περάτωση της μελέτης. Ο ίδιος βοηθούσε πρόθυμα στην επίλυση κάθε προβλήματος που ανέκυπτε με τους έγκυρους

και ακριβείς χειρισμούς του. Χωρίς τη στήριξη αυτού και των συνεργατών του εργαστηρίου του η περάτωση του παρόντος πονήματος δε θα ήταν ασφαλώς ποτέ εφικτή. Τους ευχαριστώ όλους θερμά για την πολύτιμη βοήθεια τους.

## **Εισαγωγή**

Στην περασμένη δεκαετία καταγράφηκε ένας καταγισμός πληροφοριών που αφορούν την αιτιολογία, την πρόληψη και τη θεραπεία της αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής νόσου. Για αρκετά χρόνια οι αθηροσκληρωτικές βλάβες στον αυλό των αρτηριών θεωρήθηκαν αδρανείς πλάκες που εξελίσσονται αργά με αποτέλεσμα την απόφραξη των αρτηριών. Η εξελικτική αυτή διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα, σύμφωνα με την άποψη αυτή, το έμφραγμα του μυοκαρδίου όταν η απόφραξη αφορά τις στεφανιαίες αρτηρίες, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο όταν συμβεί στις αρτηρίες που αιματώνουν τον εγκέφαλο ή την περιφερική ισχαιμική αρτηριοπάθεια σε αγγεία των σπλάγχων και των άκρων. Νεότερα δεδομένα ωστόσο έρχονται να καταδείξουν την αθηροσκληρωτική πλάκα ως ένα ενεργές δυναμικά φλεγμονώδες υπόστρωμα το οποίο μπορεί να υποστεί αρκετές μεταβολές. Ως αποτέλεσμα αυτών των μεταβολών η πλάκα καθίσταται ασταθής και μπορεί να υποστεί ρήξη ή διάβρωση. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο συμβαίνουν πιο συχνά όταν η πλάκα υφίσταται ρήξη ή διαβρώνεται.

Κεντρικό ρόλο στη δημιουργία της αθηρογένεσης παίζουν ορισμένες λιποπρωτεΐνες ιδιαίτερα οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL). Στα χρόνια που πέρασαν πολλά έγιναν γνωστά για το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών αυτών, ο γενικός πληθυσμός σταδιακά μειώνει την LDL με παρεμβάσεις στην καθημερινή του διατροφή, ενώ πρόσφατα στη φαρέτρα της καταπολέμησης της αθηροσκλήρωσης έχουν εισβάλλει επιτυχώς διάφορες φαρμακευτικές ουσίες. Τα φαρμακευτικά σκευάσματα αυτά σε συνδυασμό με τον έλεγχο των άλλων παραγόντων κίνδυνου

έχουν καταφέρει να μειώσουν αρκετά την πιθανότητα καρδιαγγειακών συμβαμάτων ως απότοκα της αθηροσκλήρωσης. Παρόλα αυτά τα οφέλη αντισταθμίζονται μερικώς από την αυξανόμενη επίπτωση της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου.

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μια δυνητικά νοσογόνο οντότητα που λόγω διατροφικών κυρίως έξεων πλήττει ιδιαίτερα τις δυτικού τύπου κοινωνίες. Τα αλματώδη βήματα που καταγράφονται τα τελευταία χρόνια σε ολόκληρο το φάσμα των ανθρωποκεντρικών επιστημών έχουν βοηθήσει το σύγχρονο επιστήμονα αφενός να κατανοεί ολοένα και καλύτερα τους μηχανισμούς οι οποίοι συμβάλλουν στην ανάπτυξη της οντότητας αυτής και αφετέρου να την αντιμετωπίσει αποτελεσματικότερα. Έτσι, έρχονται συνεχώς στο φως νεότερα δεδομένα που σχετίζονται με τις **γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs)** και τους τρόπους δράσεως των μορίων αυτών. Ο φακός της βιοχημικής επιστήμης έχει εστιάσει αρκετά στους ετεροπολυσακχαρίτες αυτούς, οι οποίοι εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια των κυττάρων ή στον εξωκυττάριο χώρο (ECM) και φαίνεται να διαδραματίζουν καταλυτικούς ρόλους στην έναρξη και ανάπτυξη της αθηροσκληρωτικής νόσου. Σκοπός της παρούσης διδακτορικής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των ουσιών αυτών και ιδιαίτερα της **θεικής χονδροϊτίνης (CS)** στον ορό του αίματος στεφανιαίων ασθενών, καθώς επίσης και η αποσαφήνιση του μοντέλου μεταβολής των τιμών αυτής σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη. Για την εκπόνηση της διατριβής αυτής απαιτήθηκε η αγαστή συνεργασία διαφόρων κλάδων της ιατρικής επιστήμης όπως της καρδιοχειρουργικής, της καρδιολογίας, της βιοχημείας και της ιατρικής στατιστικής. Το αποτέλεσμα ήταν η ολοκλήρωση μιας πρωτότυπης μελέτης η οποία συνδύασε την κλινική πράξη με την βασική έρευνα, τα μυστικά και την πολυπλοκότητα των χειρουργείων της καρδιάς με τις βασικές αρχές και νέες τάσεις της χημείας και της βιοχημείας.



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

### ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ- ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

#### ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Με τον όρο αθηροσκλήρωση (atherosclerosis) περιγράφεται η προοδευτική λιπώδης και εκφυλιστική νόσος του έσω κυρίως χιτώνα των αρτηριών που οδηγεί σε στένωση ή απόφραξη του αυλού της προσβεβλημένης αρτηρίας με αποτέλεσμα την ισχαιμική βλάβη ή τη νέκρωση των ιστών που αρδεύονται από αυτήν. Είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που αρχίζει από την παιδική ηλικία και καταλήγει σε ένα φάσμα σοβαρών αγγειακών παθήσεων. Οι αθηροσκληρωτικές βλάβες είχαν παρατηρηθεί από αιώνες αλλά ο James Herrick το 1912 ήταν ο πρώτος που συσχέτισε την αθηροσκλήρωση των στεφανιαίων αρτηριών με την ισχαιμική καρδιακή νόσο [1]. Έκτοτε η αθηροσκλήρωση και τα κλινικά φαινόμενα που τη συνοδεύουν αυξήθηκαν ραγδαία με αποτέλεσμα να έχουν πάρει επιδημικές διαστάσεις στις μέρες μας και ιδιαίτερα στις Δυτικές κοινωνίες. Οι όροι αθήρωμα και αθηροσκλήρωση είναι ελληνικοί και σύνθετοι (αθήρη = χυλός και όμα = μάζα). Χρησιμοποιήθηκαν δε για πρώτη φορά από το Γαληνό (131-201 μ.Χ.) [2]. Η ανάπτυξη ινώδους ιστού και η εναπόθεση αλάτων ασβεστίου στις αθηρωματικές πλάκες μπορεί να οδηγήσει σε αρτηριοσκλήρωση. Ο όρος αυτός σημαίνει σκλήρυνση του τοιχώματος των αρτηριών και μπορεί να οφείλεται και σε άλλες αιτίες εκτός της αθηροσκλήρωσης.

Στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης εμπλέκονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς επίσης και τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα αιμοπετάλια και τα T-λεμφοκύτταρα [3,4,5]. Σημαντικός φαίνεται να είναι επίσης και ο ρόλος που διαδραματίζουν ορισμένοι μοριακοί παράγοντες στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης, όπως είναι στοιχεία του συνδετικού ιστού του έσω τοιχώματος των αρτηριών, δηλαδή το κολλαγόνο, η ελαστίνη και πρωτεογλυκάνες θειϊκής χονδροϊτίνης [6-8]. Οι αλυσίδες των θειϊκών χονδροϊτινών και ιδιαίτερα οι πλούσιες σε 4-θειωμένες υποομάδες φαίνεται να διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο προστατεύοντας την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low Density Lipoprotein-LDL) [5,7]. Στην όλη διαδικασία παίρνουν μέρος ακόμη κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες μόρια προσκόλλησης αγγειοδραστικές αμίνες κ.α. Πρέπει ωστόσο να σημειώσουμε ότι ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι περισσότεροι από τους παραπάνω παράγοντες συμμετέχουν παραμένει ως ένα βαθμό ακόμη αδιευκρίνιστος.

Κατά καιρούς έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες σχετικά με το μηχανισμό γένεσης της αθηρωματικής πλάκας. Η θεωρία του Virchow ( 1912 ) τροποποιημένη από τον Ross ( 1990 ) φαίνεται να είναι η επικρατέστερη [2-5]. Σύμφωνα με αυτή το αρχικό γεγονός για τη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας είναι η « βλάβη » του ενδοθηλίου. Διάφοροι βλαπτικοί παράγοντες που δρουν επί μακρόν (σακχαρώδης διαβήτης, υπερλιπιδαιμία, νικοτίνη, υπέρταση, γενετικοί παράγοντες ή συνδυασμοί τους) προκαλούν δυσλειτουργία στο ενδοθήλιο. Αυτοί δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για να γίνει η κατακράτηση της LDL υπενδοθηλιακά (στη θεμέλιο ουσία του έσω χιτώνα). Επί απουσίας αντιοξειδωτικών ουσιών κάτω από το ενδοθήλιο η LDL οξειδώνεται βαθμιαία [9]. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια τόσο των κυτταρικών οξυγενασών όσο και των ελεύθερων ριζών οξυγόνου που αφθονούν σε ποικίλες

καταστάσεις ( π.χ. υπέρταση ). Η οξειδωμένη LDL ερεθίζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να παράγουν ουσίες που προκαλούν στην εν λόγω περιοχή τη μετανάστευση των μονοκυττάρων ή μακροφάγων με μια διαδικασία που προσομοιάζει με αυτή της φλεγμονής. Τα μακροφάγα που έχουν φτάσει στην περιοχή οξειδώνουν πλήρως την LDL ( τόσο το πρωτεϊνικό όσο και το λιπιδιακό της μέρος) . Ακολουθεί φαγοκυττάρωση της χημικά αλλοιωμένης πλέον LDL από τα μακροφάγα τα οποία μετατρέπονται στη συνέχεια σε αφρώδη κύτταρα. Το επόμενο βήμα σε αυτόν τον καταρράκτη χημικών αλληλεπιδράσεων είναι η μετανάστευση στην περιοχή της βλάβης των λείων μυϊκών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά προσεγγίζουν την περιοχή εξαιτίας μιας πληθώρας χημειοτακτικών και αυξητικών ουσιών που έχουν εκλυθεί από τα μακροφάγα. Τα λεία μυϊκά κύτταρα μετατρέπονται και αυτά σε αφρώδη κύτταρα. Η συνεχώς παραγόμενη οξειδωμένη LDL δρα κυτταροτοξικά στα κύτταρα του ενδοθηλίου και αυτό συνεπάγεται την προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Οι αλλαγές αυτές φαίνονται συνοπτικά στο σχήμα 1. [2-5, 10]



Σχήμα.1 Τα επιμέρους στάδια εξέλιξης της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας.

## **Κλινικές εκδηλώσεις αθηροσκλήρωσης**

Οι κλινικές εκδηλώσεις της αθηροσκλήρωσης προκύπτουν από τις ισχαιμικές αλλοιώσεις των οργάνων των οποίων οι αρδεύουσες αρτηρίες έχουν προσβληθεί από αθηροσκλήρωση. Αυτές επιγραμματικά είναι :

- ✓ Στεφανιαία νόσος- έμφραγμα μυοκαρδίου. Συγκαταλέγονται στις συχνότερες και σοβαρότερες επιπλοκές
- ✓ Οξεία και χρόνια εγκεφαλική ισχαιμία και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.
- ✓ Ισχαιμία των σπλάχνων ( μεσεντέρια ισχαιμία)
- ✓ Νεφραγγειακή υπέρταση
- ✓ Χρόνια αποφρακτική νόσος των κάτω άκρων
- ✓ Σύνδρομο αθηρωματώδους εμβολής συνεπεία μικροεμβόλων που αποκολλούνται από την αθηροσκληρωτική επιπλεγμένη πλάκα
- ✓ Αποτελεί συχνή αιτία αρτηριακού ανευρύσματος
- ✓ Τέλος όταν μια οξεία αρτηριακή απόφραξη δεν μπορεί να αποδοθεί σε εμβολή καρδιακής προέλευσης η σε εξωαυλικά αίτια, αποδίδεται σε αθηροσκλήρωση[10].

## **Παράγοντες κινδύνου αθηροσκλήρωσης-Μέτρα αντιμετώπισης**

Η αθηροσκλήρωση ξεκινά ύπουλα και σιωπηλά από την παιδική ή εφηβική ηλικία, εξελίσσεται βαθμιαία και εκδηλώνεται μετά την 3<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής συνήθως με ισχαιμική νόσο ( στεφανιαία νόσο ή περιφερική αγγειοπάθεια). Στο σχήμα 2 φαίνονται οι σημαντικότεροι παράγοντες που δυνητικά προκαλούν αθηροσκλήρωση. Επιπλέον παράγοντες θεωρούνται το στρες, η ηλικία ( συχνότερα 45-65 έτη), το φύλο

(πιο σπάνια στις γυναίκες), το θετικό οικογενειακό ιστορικό , η λιποπρωτεΐνη-α[LP(a)], το ινωδογόνο κ.α.



Σχήμα 2. Οι κυριότεροι αθηροσκληρωτικοί παράγοντες κίνδυνου σχηματικά.

Ο χρυσός κανόνας και το πιο αδιαμφισβήτητο μέτρο για την αντιμετώπιση αυτής της νοσολογικής οντότητας είναι η διαρκής και συντονισμένη προσπάθεια για τη διόρθωση όλων των αναστρέψιμων παραγόντων κινδύνου σε συνδυασμό με την κατάλληλη φαρμακευτική θεραπεία.

Η ρύθμιση της αρτηριακής υπέρτασης που αποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες κινδύνου με τελικό αποτέλεσμα στενωτικές-ισχαιμικές αλλοιώσεις στα στεφανιαία και εγκεφαλικά αγγεία αποτελεί κομβικό σημείο. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της συστολικής ή διαστολικής πίεσης και για περισσότερα χρόνια τόσο συχνότερος ο κίνδυνος υπερτροφίας της αριστεράς κοιλίας με αποτέλεσμα την εκδήλωση αρρυθμιών και ισχαιμικών καρδιακών επεισοδίων [11-16].

Το κάπνισμα παίζει πρωταρχικό ρόλο και αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου. Η πίσσα, η νικοτίνη και το μονοξείδιο του άνθρακα (ουσίες που περιέχονται στο τσιγάρο) επιβαρύνουν και αλλοιώνουν το αγγειακό σύστημα ποικιλοτρόπως [2].

Οι διαβητικοί ασθενείς ανεξάρτητα φύλου διατρέχουν τουλάχιστον διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκληρωτικής νόσου. Ο σακχαρώδης διαβήτης ευθύνεται για διαταραχές των λιπιδίων γεγονός που συμβάλει στην επιτάχυνση της αθηρογένεσης [2-5].

Από τη μελέτη του Framingham το 1942 έχει δημοσιευτεί πλήθος μελετών που συνδέουν άρρηκτα την ολική χοληστερόλη και ιδιαίτερα την LDL-χοληστερόλη με τη στεφανιαία νόσο και την αθηροσκλήρωση γενικότερα, καθιστώντας έτσι τον παράγοντα αυτό ιδιαίτερα καταλυτικό [3]. Τα τελευταία χρόνια όμως έχει τύχει ευρείας αποδοχής η χορήγηση των στατινών που αποτελούν φάρμακα εκλογής για τη μείωση της LDL-χοληστερόλης. Οι ουσίες αυτές (αναστολείς ενζύμου 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA αναγωγής ή HMG-CoA αναγωγής) μειώνουν την παραγωγή χοληστερόλης από το ήπαρ και ενεργοποιούν τους ηπατικούς υποδοχείς της LDL-χοληστερόλης. Άλλα φάρμακα που χρησιμοποιούνται επίσης με διαφορετικούς όμως μηχανισμούς δράσης είναι οι φιβράτες, η νιασίνη και τα ιχθυέλαια (Ω-3-λιπαρά οξέα).

Θα πρέπει να γίνει επίσης αναφορά στην απουσία σωματικής άσκησης και στην παχυσαρκία. Η σωματική άσκηση :

- Ελαττώνει το σωματικό βάρος τη αρτηριακή πίεση και το στρες.
- Δραστηριοποιεί το ινωδολυτικό σύστημα αφού ενεργοποιεί το πλασμινογόνο.
- Ελαττώνει τη χοληστερίνη, τα τριγλυκερίδια και την LDL.
- Μειώνει τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων.

Από την άλλη πλευρά η παχυσαρκία προκαλεί ινσουλινοαντοχή, με αποτέλεσμα υπερινσουλαιμία, διαβήτη, υπερτριγλυκεριδαιμία, υπερχοληστερολαιμία, ελάττωση της HDL-χοληστερόλης (High Density Lipoprotein) και υπέρταση [17]. Η

παχυσαρκία και ειδικά η κεντρικού τύπου είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας υπέρτασης [11-16].

Τέλος παράγοντας κινδύνου όχι ανεξάρτητος που αξίζει όμως να αναφερθεί γιατί γίνεται πολύς λόγος στις μέρες μας είναι το πρότυπο δίαιτας δυτικού τύπου. Αυτή περιλαμβάνει τροφές με υψηλή αναλογία χοληστερόλης και κορεσμένων λιπαρών, κατανάλωση μεγάλων ποσοστών λίπους, άλατος, ζάχαρης και αλκοόλ. Είναι μια υπερθερμιδική δίαιτα που αυξάνει σε μεγάλο βαθμό τον κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου.

## **ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ**

Με τον όρο στεφανιαία νόσο εννοούμε τη στένωση ή απόφραξη κλάδων των στεφανιαίων αρτηριών. Οφείλεται κατά κύριο λόγο στην εκφυλιστική πολυπαραγοντικής αιτιολογίας αθηρωμάτωση.

### **Επιδημιολογικά δεδομένα.**

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί μάστιγα για το σύγχρονο κόσμο και ιδιαίτερα για τις Δυτικές κοινωνίες, αφού αποτελεί την πρώτη αυτοτελή αιτία θανάτου. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι ο ετήσιος αριθμός των θανάτων από στεφανιαία νόσο στις Η.Π.Α ανέρχεται στις 700.000, ενώ των οξέων εμφραγμάτων στο 1.500.000. Από επιδημιολογικής άποψης ενδιαφέρον είναι, ότι ενώ η συχνότητα και οι θάνατοι από τη στεφανιαία νόσο μειώνονται στη Δυτική Ευρώπη, παρατηρείται αύξησή τους στις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης [17].

## **Αιτιολογία- προδιαθεσικοί παράγοντες**

Κυριότεροι προδιαθεσικοί παράγοντες ή παράγοντες κινδύνου είναι η υπερχοληστερολαιμία, η αρτηριακή υπέρταση, το κάπνισμα, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, και μάλιστα η «ανδρικού τύπου» κοιλιακή παχυσαρκία, και η γενετική προδιάθεση, ιδιαίτερα από τη μητέρα.

Η παθογένεση της νόσου βασίζεται στον τραυματισμό του ενδοθηλίου των αρτηριών με την επίδραση των παραγόντων κινδύνου και στη συνέχεια στην επίδραση μιας σειράς αγγειοκινητικών παραγόντων, φλεγμονωδών παραγόντων και παραγόντων πήξης, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, η οποία στενεύει τον αυλό της στεφανιαίας αρτηρίας [18,19].

## **Κλινικές μορφές**

Αν και συχνά ασυμπτωματική, η στεφανιαία νόσος εκδηλώνεται κυρίως ως προκάρδιο άλγος με αντανάκλαση στα άνω άκρα, τη γνάθο ή με μεσορράχια εντόπιση. Μπορεί επίσης να εκδηλωθεί ως δύσπνοια, προλιποθυμικό ή λιποθυμικό επεισόδιο. Πιο αναλυτικά οι μορφές με τις οποίες εκδηλώνεται η νόσος είναι οι ακόλουθες [20]:

- i) σταθερή στηθάγχη
- ii) ασταθής στηθάγχη, που ορίζεται ως πρωτοεμφανιζόμενη στηθάγχη, στηθάγχη ηρεμίας ή στηθάγχη με μεταβαλλόμενους χαρακτήρες
- iii) στηθάγχη Prinzmetal, που οφείλεται σε σπασμό των στεφανιαίων αρτηριών



- iv) οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου
- v) αιφνίδιος θάνατος.

### **Διάγνωση**

Οι εξετάσεις που εντάσσονται στη φαρέτρα του κλινικού ιατρού για τη διάγνωση της στεφανιαίας νόσου περιλαμβάνουν το απλό ηλεκτροκαρδιογράφημα, τη δοκιμασία κοπώσεως, το υπερηχογράφημα, το σπινθηρογράφημα με θάλλιο, για έλεγχο κινητικότητας και βιωσιμότητας του μυοκαρδίου, και κυρίως, η αρτηριογραφία των στεφανιαίων αρτηριών ή στεφανιογραφία, που αν και επεμβατική μέθοδος με κάποιο συνοδό ρίσκο, αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέχρι στιγμής μέθοδο για τη διάγνωση της στεφανιαίας νόσου. Η υπό ανάπτυξη μέθοδος της μαγνητικής στεφανιογραφίας υπόσχεται πολλά για το μέλλον, αφού πρόκειται για μη αιματηρή, μη επεμβατική μέθοδο, με επιπλέον πλεονεκτήματα όσον αφορά τον τομέα της επιβάρυνσης από ακτινοβολία [21].

### **Θεραπεία**

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου βασίζεται καταρχήν στην πρόληψη και τον έλεγχο των παραγόντων κινδύνου (π.χ. αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, κάπνισμα, υπερλιπιδαιμία, παχυσαρκία). Στη συνέχεια περιλαμβάνει τη φαρμακευτική αγωγή, την επεμβατική μέθοδο της αγγειοπλαστικής με ή χωρίς τοποθέτηση ενδαγγειακών ναρθήκων (stent), καθώς και τη χειρουργική αντιμετώπιση με επαναιμάτωση με τη μέθοδο της στεφανιαίας ή αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Νεότερες από εξέλιξη μέθοδοι στη θεραπεία της στεφανιαίας νόσου

αποτελούν η επαναιμάτωση με Laser και η χρήση βλαστοκυττάρων. Εξατομικευμένα, η αντιμετώπιση περιλαμβάνει και όλους τους δυνατούς συνδυασμούς των παραπάνω μεθόδων π.χ. φαρμακευτική αγωγή μετά από αγγειοπλαστική, ή εγχείρηση, ή υβριδικές επεμβάσεις αγγειοπλαστικής και στεφανιαίας παράκαμψης.

Επιπλέον των ανωτέρω πρέπει να σημειώσουμε ότι η χειρουργική θεραπεία έχει ένδειξη και στις μηχανικές επιπλοκές του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου: το ανεύρυσμα αριστεράς κοιλίας, τη ρήξη μεσοκοιλιακού διαφράγματος, την ρήξη τοιχώματος της αριστεράς κοιλίας, και τέλος, τη μετεμφραγματική ανεπάρκεια μιτροειδούς βαλβίδας [22,23]. Κατ' επέκταση, η χειρουργική θεραπεία της στεφανιαίας νόσου περιλαμβάνει και όλο εκείνο το φάσμα των επεμβάσεων που αποσκοπούν στην αντιμετώπιση της ισχαιμικής αιτιολογίας καρδιακής ανεπάρκειας: επεμβάσεις remodeling της αριστεράς κοιλίας, τοποθέτηση συσκευών υποβοήθησης καρδιακής λειτουργίας (assist device) και τέλος τη μεταμόσχευση καρδιάς.

### **Φαρμακευτική θεραπεία**

Περιλαμβάνει παράγοντες που δρουν μέσω αγγειοδιαστολής των στεφανιαίων, μέσω ελάττωσης του προφορτίου ή του μεταφορτίου, καθώς και μέσω αναστολής της λειτουργίας των αιμοπεταλίων. Οι κυριότερες ουσίες είναι οι ακόλουθες:

- i) Αποκλειστές διαύλων ασβεστίου, η βεραπαμίλη, διλτιαζέμη και η νιφεδιπίνη
- ii) Νιτρώδη. Κυριότεροι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι ο μονονιτρικός και δινιτρικός ισοσορβίτης

- iii) Β-αποκλειστές. Αντιπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η ατενολόλη και η μετοπρολόλη
- iv) Αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης ( $\alpha$ -ΜΕΑ), π.χ. ραμιπρίλη
- v) Αντιαμοπεταλιακή αγωγή με κύριους εκπροσώπους το ακετυλσαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη) και τη σήμερα ευρέως χρησιμοποιούμενη κλοπιδογρέλη
- vi) Αντιλιπιδαιμική αγωγή με κύριους εκπροσώπους τα φάρμακα της κατηγορίας των στατινών, με δράσεις τη σταθεροποίηση, αλλά και την υποστρόφη της αθηρωματικής πλάκας. Έχει βρεθεί ότι η δράση της αντιλιπιδαιμικής αγωγής έχει ευεργετική δράση, ακόμη και σε ασθενείς με φυσιολογικές τιμές χοληστερόλης
- vii) Ηπαρίνη μεγάλου μοριακού βάρους ή ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους
- viii) Θρομβολυτικά φάρμακα, όπως η στρεπτοκινάση, η ουροκινάση, η αλτεπλάση (t-PA) και η ρετεπλάση (r-PA) [24].

### **Αγγειοπλαστική**

Η μέθοδος επινοήθηκε από τον Gruentzig το 1976 και συνίσταται στην εισαγωγή στις στεφανιαίες αρτηρίες καθετήρα που έχει στο άκρο του μπαλόνι, μέσω της μηριαίας ή της βραχιονίου αρτηρίας[25]. Στις μέρες μας η διαστολή των αγγείων έχει ενισχυθεί με την ευρεία χρήση των stents.

## Εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης

Η χειρουργική αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου βασίζεται στην επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης, ή πιο κοινά, επέμβαση bypass. Το πρώτο bypass με τη χρήση της έσω μαστικής αρτηρίας διενεργήθηκε το 1964 στην Αγία Πετρούπολη από τον Kolesov, και το πρώτο bypass με μείζονα σαφηνή φλέβα σε άνθρωπο πραγματοποιήθηκε με επιτυχία από τους Sabiston και DeBakey την ίδια χρονιά. Το 1967 εισήχθη από τον Favaloro και τους συνεργάτες του στην Cleveland Clinic, Ohio, η χειρουργική των στεφανιαίων για θεραπεία της στηθάγχης και έκτοτε έχει εξελιχθεί σε επέμβαση ρουτίνας, σε βαθμό που να πραγματοποιείται ακόμη και σε υπερήλικες ασθενείς ή ακόμη και ως επανεγχείρηση για 2<sup>η</sup> ή για 3<sup>η</sup> φορά [25].

Η επαναιμάτωση του μυοκαρδίου που αρδεύεται από στενωμένους ή αποφραγμένους κλάδους των στεφανιαίων αρτηριών επιτυγχάνεται με τη σύνδεση αυτών με την αορτή μέσω αυτόλογων μοσχευμάτων είτε της έσω μαστικής αρτηρίας (μέσω της υποκλειδίου αρτηρίας), είτε της κερκιδικής αρτηρίας ή της μείζονος σαφηνούς φλέβας. Τόσο η κεντρική αναστόμωση στην αορτή, όσο και η περιφερική αναστόμωση στο στεφανιαίο αγγείο γίνονται τελικοπλάγια. Η επέμβαση μπορεί να διενεργηθεί με ή χωρίς τη βοήθεια εξωσωματικής κυκλοφορίας [25-27]. Πιο αναλυτικά οι τύποι της επέμβασης είναι:

- i) επέμβαση bypass με μέση στερνοτομή και εξωσωματική κυκλοφορία
- ii) επέμβαση bypass με μέση στερνοτομή χωρίς εξωσωματική κυκλοφορία, σε πάλλουσα καρδιά (off-pump)
- iii) ελάχιστα επεμβατική μέθοδος με πρόσθια θωρακοτομή, χωρίς εξωσωματική κυκλοφορία και αναστόμωση της αριστεράς έσω μαστικής

αρτηρίας στον πρόσθιο κατιόντα ή τον διαγώνιο κλάδο της αριστεράς στεφανιαίας αρτηρίας-MIDCAB (minimal invasive direct coronary artery bypass)

- iv) υποβοηθούμενη από τη μηχανή (pump-assisted) επέμβαση, κατά την οποία χωρίς καρδιοπληγική παύση, η καρδιά υποβοηθείται σε κάποιο βαθμό για ασφάλεια από την εξωσωματική κυκλοφορία
- v) εγχείρηση σε υποθερμία και ηλεκτρικά προκαλούμενο ινιδισμό,
- vi) ολική αρτηριακή επαναιμάτωση, με χρησιμοποίηση της αριστεράς ή και της δεξιάς έσω μαστικής αρτηρίας και άλλων αρτηριακών κλάδων, όπως η κερκιδική ή η γαστρεπιπλοϊκή αρτηρία, σε νέα άτομα για μακρύτερο χρόνο λειτουργίας των παρακάμψεων
- vii) ρομποτική επέμβαση, κατά την οποία οι κινήσεις του χειρουργού σε ειδική κονσόλα μεταφέρονται και εκτελούνται με ακρίβεια από ρομπότ, ακόμη και από απόσταση.

### **Ενδείξεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης**

Ο βαθμός στένωσης ενός στεφανιαίου αγγείου, ώστε να καταστεί παρακάμψιμο, έχει οριστεί στο 70%, ενώ το εύρος του αυλού του στο 1,5 mm. Με δεδομένες και τις παραπάνω γνώσεις, οι ενδείξεις για την αορτοστεφανιαία παράκαμψη είναι οι ακόλουθες:

- i) στεφανιαία νόσος τριών αγγείων σε ασθενείς με μειωμένο κλάσμα εξώθησης, ή σακχαρώδη διαβήτη
- ii) νόσος στελέχους της αριστεράς στεφανιαίας αρτηρίας

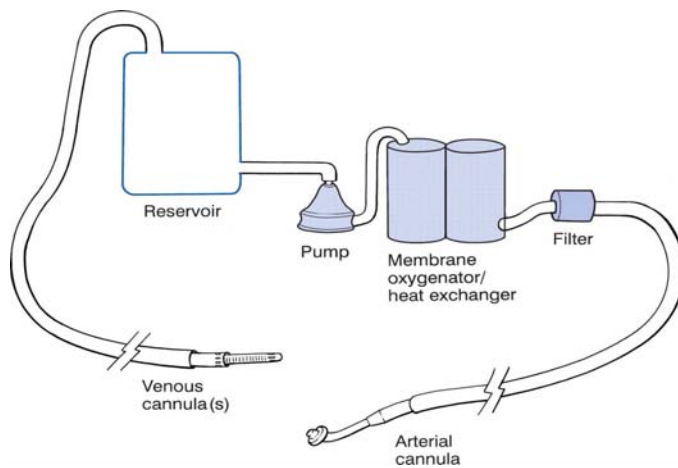
- iii) ισοδύναμο στελέχους, με βλάβη στα εγγύς τμήματα του προσθίου κατιόντος και επιχείλιου κλάδου
- iv) εγγύς νόσος προσθίου κατιόντος
- v) αποτυχία αγγειοπλαστικής
- vi) αιμοδυναμική αστάθεια επί οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου [25-30].

### **Εξωσωματική κυκλοφορία**

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει πραγματοποιηθεί στον τομέα των εγχειρήσεων σε πάλλουσα καρδιά, η μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας αποτελεί το απαραίτητο εργαλείο για τη διενέργεια της συντριπτικής πλειοψηφίας των καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων.

Η μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας αποτελείται από τα ακόλουθα τμήματα:

- i) Το φλεβικό ρεζερβουάρ, όπου καταλήγει το αίμα του φλεβικού σωλήνα με τη δύναμη της βαρύτητας
- ii) Την αρτηριακή αντλία
- iii) Τον οξυγονωτή, που αρχικά ήταν οξυγονωτής φυσαλίδων και τελευταία μόνο οξυγονωτής μεμβράνης
- vi) Το αρτηριακό φίλτρο
- v) Τη συσκευή θέρμανσης-ψύξης
- vi) Την αντλία αναρρόφησης
- vii) Την αντλία του vent για αποσυμφόρηση της αριστεράς κοιλίας
- viii) Τον αρτηριακό σωλήνα.



Σχήμα 3. Η συνδεσμολογία της μηχανής εξωσωματικής κυκλοφορίας.

Για την είσοδο στην εξωσωματική κυκλοφορία απαιτείται συστηματικός ηπαρινισμός που έχει ως στόχο τιμή του ACT (activated clotting time) μεγαλύτερη των 400-475 δευτερολέπτων. Κατά το τέλος της εγχείρησης, η δράση της ηπαρίνης εξουδετερώνεται με τη χορήγηση θεικής πρωταμίνης. Πιο συγκεκριμένα, 1 mg πρωταμίνης εξουδετερώνει 100 μονάδες ηπαρίνης [25,26,29].

Ένα πρώτο πρόβλημα που σχετίζεται με το συστηματικό ηπαρινισμό αποτελεί η εκδήλωση σε μερικούς ασθενείς θρομβοκυττοπενίας (Heparin induced thrombocytopenia-HIT), και ιδιαίτερα του βαρύτερης πρόγνωσης τύπου II. Επί σχετικής υποψίας συνιστάται η χορήγηση ουσιών αναλόγων της ηπαρίνης (δαπαρινοειδή), καθώς και αιμοπεταλίων.

Μία δεύτερη δυσκολία παρατηρείται στους ασθενείς που εμφανίζουν ανοχή στην ηπαρίνη, και παρά τη χορήγηση επαρκούς δόσης, δεν φθάνουν την επιθυμητή τιμή ACT. Το πρόβλημα έγκειται στην έλλειψη αντιθρομβίνης, που αποτελεί μέσο για τη δράση της ηπαρίνης και αντιμετωπίζεται με τη χορήγηση FFP (fresh frozen plasma).

Τα σημαντικότερα προβλήματα από την εφαρμογή της εξωσωματικής κυκλοφορίας σχετίζονται με την επαφή του αίματος με τις ξένες επιφάνειες της μηχανής και τον συστηματικό ηπαρινισμό. Η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση αποτελεί την

αιτία των περισσότερων επιπλοκών από την εξωσωματική κυκλοφορία. Χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση του συμπληρώματος και άλλων μορίων, όπως οι λευκοτριένες και οι κυτταροκίνες, από μετακίνηση υγρών στο διάμεσο χώρο και από ποικίλες αιματολογικές διαταραχές και διαταραχές πήξεως [25,26,29].

Συχνές, τέλος, επιπλοκές που σχετίζονται με την εξωσωματική κυκλοφορία αποτελούν τα θρομβοεμβολικά επεισόδια, από αέρα, θρόμβους, ή τεμάχια αθηρώματος.

Πιο αναλυτικά, περιεγχειρητικά συμβάμματα που σχετίζονται με την εξωσωματική κυκλοφορία είναι τα ακόλουθα:

- i) νευρολογικές επιπλοκές, όπως αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, (σε ποσοστό ως 3%), παροδικό ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, (3%), μετεγχειρητική έκπτωση της νοητικής λειτουργίας, μετεγχειρητικό οργανικό ψυχοσύνδρομο, (rump syndrome, συχνότητα ως 30%)
- ii) ηπατική δυσλειτουργία, σε ποσοστό ως 25%
- iii) νεφρική δυσλειτουργία, είτε ως νεοεμφανιζόμενη, είτε ως επιδείνωση προεγχειρητικά εγκατεστημένης νεφρικής ανεπάρκειας
- iv) διαταραχές πήξης και μετεγχειρητική αιμορραγία, σε ποσοστό ως 5%, ανάλογα και με τον τύπο της επέμβασης
- v) γαστρεντερικές διαταραχές, όπως ισχαιμική εντερίτις, μετεγχειρητική παγκρεατίτις και λιθιασική ή συνηθέστερα αλιθιασική χολοκυστίτις, αιμορραγία από το πεπτικό σύστημα

Παρά τα ανωτέρω, οι επεμβάσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης σε πάλλουσα καρδιά (off-pump), δεν κερδίζουν από ένα σημείο και πέρα έδαφος, κυμαινόμενες παγκοσμίως σε ποσοστά 21% του συνόλου των επεμβάσεων [25-29]. Αυτό



πιθανότατα οφείλεται και στη δυσκολία της τεχνικής και της εκμάθησής της και στην κατώτερη, κατά πολλούς, ποιότητα των αναστομών σε πάλλουσα καρδιά.

Ως συμπέρασμα μπορεί να ειπωθεί ότι η εξωσωματική κυκλοφορία αποτελεί απαραίτητο εργαλείο στα χέρια του καρδιοχειρουργού και του ειδικού τεχνικού, απαιτεί όμως ιδιαίτερη προσοχή και λήψη όλων των απαραίτητων μέτρων ασφαλείας, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση της [25,27].



Σχήμα 4. Φωτογραφία της μηχανής εξωσωματικής κυκλοφορίας που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.**

### **ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΕΣ ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ**

#### **Γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs)**

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) αποτελούν τους πλέον άφθονους ετεροπολυσακχαρίτες στον ανθρώπινο οργανισμό. Πρόκειται για επιμήκεις, μη διακλαδιζόμενους πολυσακχαρίτες που περιέχουν επαναλαμβανόμενες δισακχαρικές μονάδες. Οι δισακχαρικές μονάδες αποτελούνται από μια τροποποιημένη εξόζη, την *N*-ακετυλογαλακτοζαμίνη (GalNAc) ή την *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc), και ένα ουρονικό οξύ, το γλυκουρονικό (GlcA) ή ιδουρονικό οξύ (IdoA). Σύμφωνα με τον τύπους των μονοσακχαριτών και τους μεταξύ τους γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι GAGs διακρίνονται σε: (1) υαλουρονικό οξύ (HA), (2) θεική χονδροϊτίνη (CS) και θεική δερματάνη (DS), (3) θεική ηπαράνη (HS) και ηπαρίνη και (4) θεική κερατάνη (KS) [31].

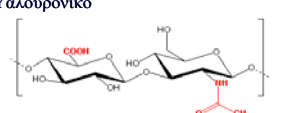
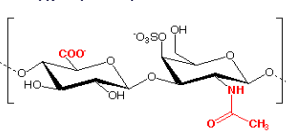
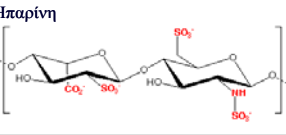
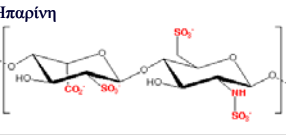
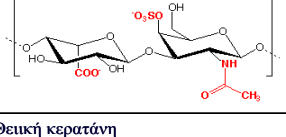
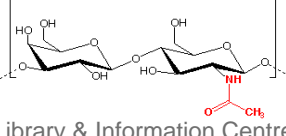
#### **Χαρακτηριστικά και εντοπισμός των GAGs**

Οι GAGs είναι αρνητικά φορτισμένα μόρια με εκτεταμένη διαμόρφωση που προσδίδει υψηλό ιξώδες σε διαλύματα. Εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια των κυττάρων ή στον εξωκυττάριο χώρο (ECM). Επιπρόσθετα, χαρακτηρίζονται από μικρή συμπίεστικότητα γεγονός που κάνει τα μόρια αυτά ιδανικά λιπαντικά των αρθρώσεων. Η ακαμψία των GAGs παρέχει στα κύτταρα δομική ακεραιότητα και παρέχει διόδους μεταξύ των κυττάρων που επιτρέπουν την κυτταρική μετανάστευση [32].

Παρά το γεγονός ότι κάθε GAG έχει ένα κυρίαρχο δισακχαριτικό συστατικό, η ετερογένεια υφίσταται στα σάκχαρα που συνιστούν οποιαδήποτε τάξη των GAGs. Το υαλουρονικό οξύ (HA) είναι μοναδικό μεταξύ των GAGs, καθώς δεν περιέχει θειικές ομάδες και δεν εντοπίζεται ομοιοπολικά συνδεδεμένο με πρωτεΐνες, όπως οι πρωτεογλυκάνες. Ωστόσο, το HA συνδέεται μη ομοιοπολικά με πρωτεογλυκάνες σχηματίζοντας μεγάλα σύμπλοκα στον εξωκυττάριο χώρο. Τα πολυμερή του υαλουρονικού οξέος είναι μόρια μεγάλου μεγέθους (μοριακά βάρη από 10.000 έως 10.000.000) και μπορούν να εκτοπίσουν μεγάλους όγκους νερού γεγονός που καθιστά το HA εξαιρετικό λιπαντικό και απορροφητή κραδασμών [32,33]. Στον πίνακα (πιν. 1) που ακολουθεί φαίνονται οι τύποι των γλυκοζοαμινογλυκανών, (υαλουρονικό οξύ, θειϊκή χονδροϊτίνη, θειϊκή δερματάνη, θειϊκή ηπαράνη, ηπαρίνη, θειϊκή κερατάνη) οι χημικές δομές τους, καθώς επίσης και οι κύριες πηγές προέλευσης τους.

**Πίνακας 1.** Τύποι GAGs και κύριες πηγές προέλευσης

Πηγή: N. Καραμάνος, Προκεχωρημένη Βιοχημεία II, Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, ΜΔΕ "Εφαρμοσμένη Βιοχημεία-Βιοτεχνολογία", Πανεπιστήμιο Πατρών, 2006

GAG	Εντοπισμός	Σχόλια
 <p>Υαλουρονικό</p>	Αρθρικό υγρό, υαλώδες υγρό, ECM χαλαρού συνδετικού ιστού	Μεγάλα πολυμερή, απορροφούν κραδασμούς
 <p>Θειϊκή χονδροϊτίνη</p>	Χόνδρος, οστά, καρδιακές βαλβίδες	Η πιο άφθονη GAG
 <p>Θειϊκή ηπαράνη</p>	Βασικές μεμβράνες, συστατικά κυτταρικών μεμβρανών	Περιέχει περισσότερη ακετυλιωμένη γλυκοζαμίνη από την ηπαρίνη
 <p>Ηπαρίνη</p>	Συστατικό των ενδοκυτταρικών κοκκίων των μαστικών κυττάρων, στο εσωτερικό των αρτηριών πνευμόνων, στο ήπαρ, στο δέρμα	Περισσότερο θειωμένη από τη θειϊκή ηπαράνη, περιέχει N-σουλφονυλιωμένη GlcN
 <p>Θειϊκή δερματάνη</p>	Δέρμα, αιμοφόρα αγγεία, καρδιακές βαλβίδες	Περιέχει D-GlcA και L-idoA
 <p>Θειϊκή κερατάνη</p>	Κερατοειδής χιτώνας, οστά, χόνδρος σε σσσωμάτωμα με θειϊκή χονδροϊτίνη	Δεν περιέχει ουρονικό οξύ

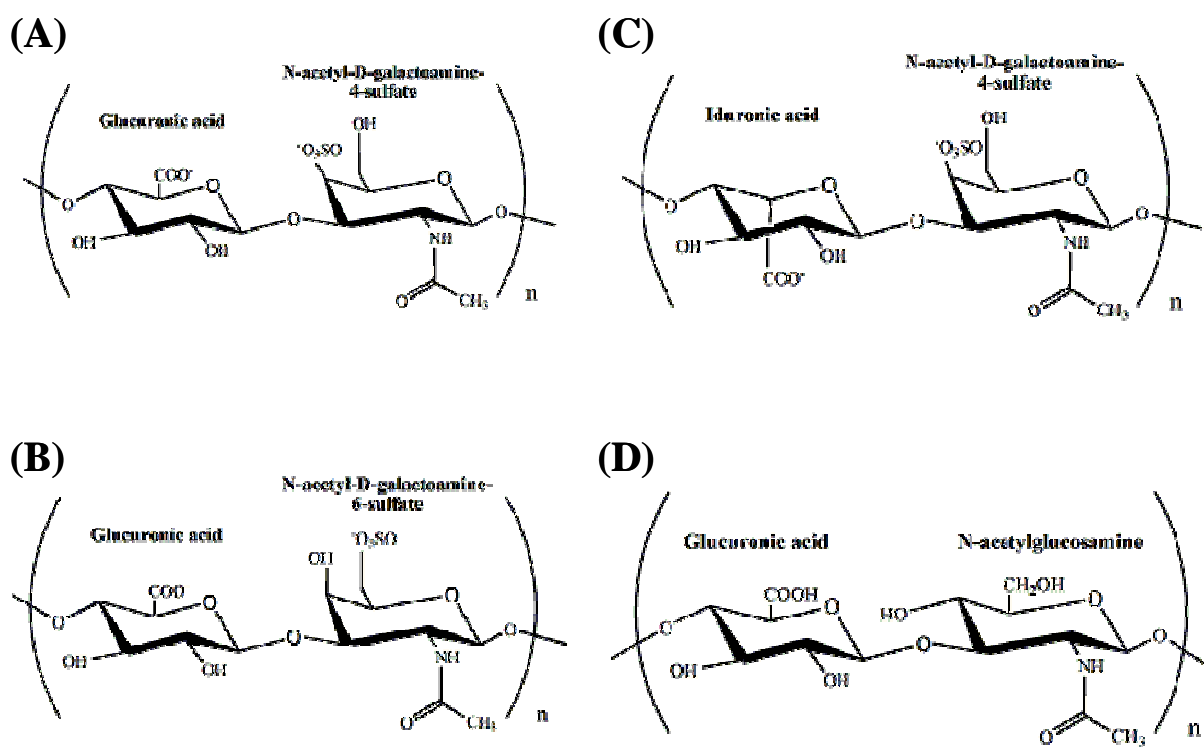
## Ο ρόλος των GAGs στην αθηροσκλήρωση

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) είναι σημαντικά μόρια του αρτηριακού τοιχώματος με πολύ λειτουργικό και ιδιαίτερο ρόλο. Εκτός από το υαλουρονικό οξύ (HA), όλες οι υπόλοιπες γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) συντίθενται ως τμήμα πρωτεογλυκανικών μορίων (PGs) όπου είναι δεσμευμένες σε ένα πρωτεϊνικό κορμό. Το αρνητικό φορτίο των σουλφονομάδων επηρεάζει τον καταμερισμό των ιόντων, τις μεταβολές λόγω όσμωσης και την ενυδάτωση του ινώδους δικτύου. Η εξωκυττάρια ουσία λειτουργεί επίσης σαν βιολογικός ηθμός πάνω στον οποίο διάφορα μακρομόρια αλληλεπιδρώντας με GAGs καθορίζουν σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση των κυττάρων, την κίνηση των κυττάρων και την πήξη του αίματος. Οι βαθμιδώσεις στην πίεση που ελέγχουν την ενυδάτωση, μπορεί να επηρεάσουν τις αλληλεπιδράσεις των GAGs με πρωτεΐνες του πλάσματος. Από τις γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs), η θειική χονδροϊτίνη (CS) και η θειική δερματάνη (DS) αποτελούν τους κύριους εκπροσώπους των αρτηριακών γλυκοζαμινογλυκανών. Οι πρωτεογλυκάνες θειικής χονδροϊτίνης/θειικής δερματάνης (CS/DS PGs) συμμετέχουν σε πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες μέσω των αλυσίδων GAGs και εμπλέκονται επίσης στην δημιουργία νοσογόνων καταστάσεων που αναπτύσσονται στο αρτηριακό τοίχωμα. [32, 33, 34].

Οι GAGs/PGs του αρτηριακού τοιχώματος υφίστανται συγκεκριμένες τροποποιήσεις κατά την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, ενώ σύμφωνα με νέα δεδομένα εμπλέκονται στην ανευρυσματική διάταση της κοιλιακής αορτής. [35, 36].

Η θειική χονδροϊτίνη (CS) είναι ένας ανιονικός, γραμμικός πολυσακχαρίτης που συντίθεται ως τμήμα πρωτεογλυκανικών μορίων (PGs) σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα. Η θειική χονδροϊτίνη αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες

γλυκουρονικού οξέος (GlcA) και *N*-ακετυλο-γαλακτοζαμίνης (GalNAc) και δεσμεύεται στον πρωτεϊνικό κορμό σε σερίνη (Ser) μέσω ενός τετρασακχαρίτη. Παρά το γεγονός ότι η δομή της CS δεν είναι περίπλοκη, το μόριο της καθορίζει πολλές σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Η θειϊκή χονδροϊτίνη συντίθεται από την επαναλαμβανόμενη μονάδα  $[\rightarrow 4\text{GlcA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow]$ , η οποία στα θηλαστικά είναι συνήθως θειωμένη στον άνθρακα C-4 ή C-6 της *N*-ακετυλο-γαλακτοζαμίνης (Σχήμα 5).

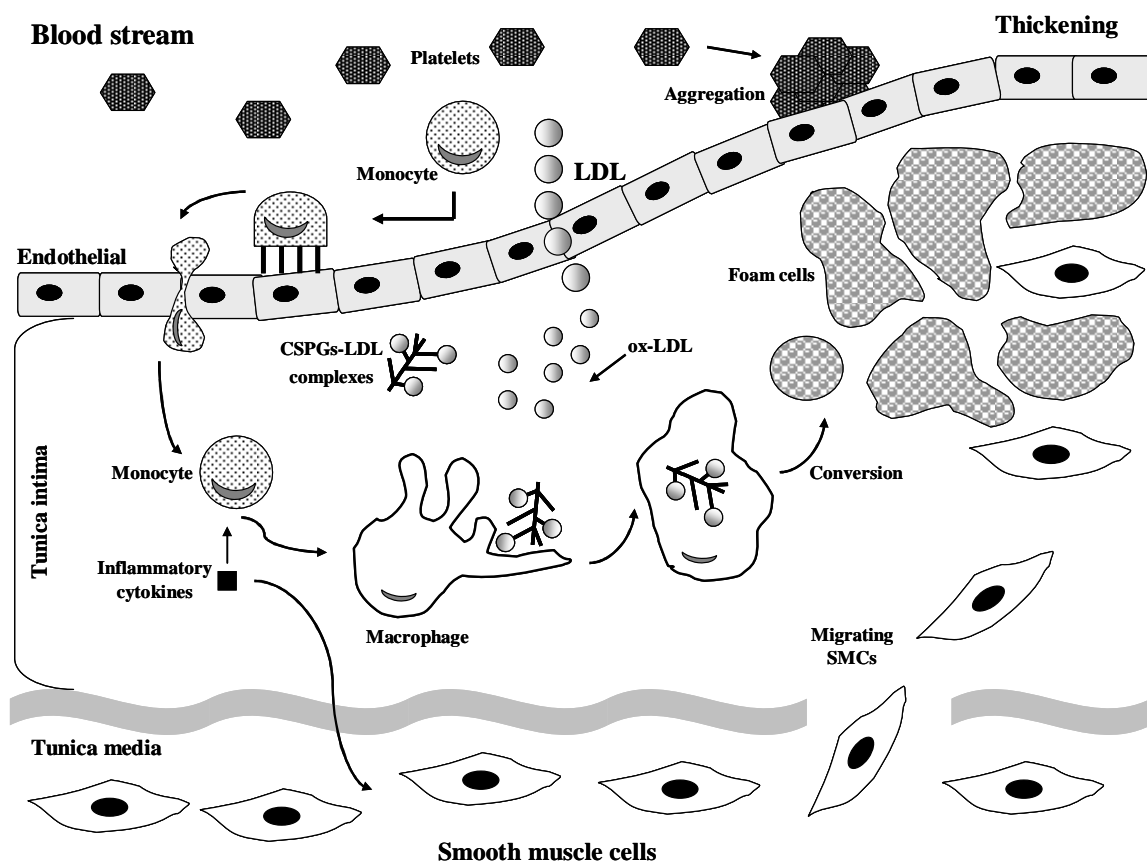


Σχήμα 5. Η βασική δομή των επαναλαμβανόμενων δισακχαριτικών ομάδων των κύριων Gags. Η θείωση της CS στη θέση C-4 (A), και C-6 (B) της GalNAc, η δισακχαριτική ομάδα του υαλουρονικού οξέος (C) και της θειικής δερματάνης DS (D). Η CS6 επιδεικνύει υψηλότερη συγγένεια για σύνδεση με την LDL από την CS4 και την DS, ενώ το υαλουρονικό οξύ παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων.

Πηγή :Karangelis *et al.* , *Current Med. Chem.*, 2010 *in press*.

Ο βιολογικός ρόλος της θειικής χονδροϊτίνης είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τα μορφολογικά της χαρακτηριστικά και την εντόπιση της. Αλληλεπιδρά με μόρια όπως αυξητικοί παράγοντες, χυμοκίνες κυτταροκίνες, λιποπρωτεΐνες και μόρια προσκόλλησης και έτσι συμβάλει στη ρύθμιση πλήθους κυτταρικών διεργασιών. Ειδικότερα, οι αλληλεπιδράσεις αυτές εξαρτώνται από συγκεκριμένες δομές oligομερών τμημάτων (CS) και συχνά συμπεριλαμβάνουν αλληλουχίες 5-8 μονοσακχαριτών. Ορισμένες ασθένειες και νοσογόνες οντότητες όπως ο καρκίνος και η αθηροσκλήρωση συχνά συνδέονται με αλλαγές και τροποποιήσεις στη βιοσύνθεση των πρωτεογλυκανών CS (CSPGs) [34]. Η αθηροσκλήρωση είναι μια καλά μελετημένη παθολογική κατάσταση στην οποία είναι εμφανείς οι διαταραχές στην έκφραση και οι δομικές αλλαγές των CSPGs. Πιο συγκεκριμένα, το επίπεδο των CSPGs είναι σημαντικά αυξημένο στα πρώιμα αθηροσκληρωτικά τμήματα γεγονός που επηρεάζει τη κατακράτηση, μετατροπή και συσσώρευση των λιπιδίων. Επιπλέον, συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής που παρατηρείται κατά την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και επηρεάζουν τη δράση των λείων μυϊκών κυττάρων των αρτηριών. Επιπρόσθετα, επηρεάζουν τον φυσιολογικό σχηματισμό της εξωκυττάριας ουσίας (ECM). [34]. Ως γνωστόν, η κατακράτηση των λιποπρωτεϊνών στο αρτηριακό τοίχωμα θεωρείται δυνητικά αθηρογόνος. Η εναπόθεση των LDL λιποπρωτεϊνών στο ενδοθήλιο του αρτηριακού τοιχώματος είναι κριτικής σημασίας. [37,38,39]. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος των GAGs που είναι συνδεδεμένες με πρωτεογλυκάνες του καρδιαγγειακού συστήματος. Συγκεκριμένα, διαθέτουν ιξωδοελαστικές ιδιότητες, αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν τη δράση αυξητικών παραγόντων και ενζύμων και λειτουργούν ως υποδοχείς ή συνυποδοχείς στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεογλυκανών-

λιποπρωτεϊνών οφείλονται σε ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των θετικά φορισμένων τμημάτων των απολιποπρωτεϊνών και των αρνητικών φορτίων που προέρχονται κυρίως από καρβοξυλικές και θεικές ομάδες των αλυσίδων των GAGs [40] (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Στο παραπάνω σχήμα απεικονίζεται η συσσώρευση των μονοκύτταρων μακροφάγων κατά την αθηροσκληρωτική διαδικασία. Τα μονοκύτταρα αφού διαπεράσουν το ενδοθήλιο προσλαμβάνονται από τα σύμπλοκα μόρια CSPGs-LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Οι κυτταροκίνες που παράγονται ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κύτταρων. Ταυτόχρονα τα αιμοπετάλια που συσσωρεύονται στην περιοχή δημιουργούν σύμπλοκα αυξάνοντας τον κίνδυνο θρομβωτικών συμβαμάτων.

Πηγή :*Karangelis et al. , Current Med. Chem., 2010 in press.*

Ενώ στα τριχοειδή αγγεία οι πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων συνδέονται με τις VLDL λιποπρωτεΐνες, στην εξωκυττάρια ουσία του αρτηριακού τοιχώματος οι πρωτεογλυκάνες θεικής χονδροϊτίνης συνδέονται με τις LDL λιποπρωτεΐνες. Η θεική ηπαράνη έχει βρεθεί ότι συνδέει τις χαμηλής πυκνότητας β λιποπρωτεΐνες ( $\beta$ -VLDL) και ένα κατάλοιπο των χυλομικρών ( $\beta$ -VLDL+apoE), αλλά όχι την LDL. Η θεική δερματάνη έχει βρεθεί ότι ενώνεται με την LDL, αλλά όχι με την  $\beta$ -VLDL ή το κατάλοιπο χυλομικρού. Η θεική χονδροϊτίνη και η ηπαρίνη έχει βρεθεί ότι ενώνονται με όλες τις λιποπρωτεΐνες (LDL,  $\beta$ -VLDL and  $\beta$ -VLDL+apoE) με διαφορετική σχέση συγγένειας [41]. Η ντεκορίνη (πρωτεογλυκάνη θεικής χονδροϊτίνης) μπορεί να συνδεθεί σε χαμηλής πυκνότητας LDL μέσω των GAG αλυσίδων της, ενώ ταυτόχρονα ο πρωτεϊνικός κορμός της συνδέεται σε ίνες κολλαγόνου με αποτέλεσμα την κατακράτηση και συσσώρευση των λιπιδίων στο τοίχωμα του αγγείου. [42]. Η σύνδεση των apoB-100 λιποπρωτεϊνών και ιδιαίτερα των LDL, σε GAGs των πρωτεογλυκανών του εξωκυττάριου χώρου θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα στην έναρξη της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας. Σύμφωνα με μια μελέτη, οι πρωτεογλυκάνες που εκκρίνονται από λεία μυϊκά κύτταρα ή από THP-1 μακροφάγα φέρουν την CS ως κύρια γλυκοζαμινογλυκάνη και φαίνεται να έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν την LDL μέχρι να επέλθει ο κορεσμός τους [41]. Η βερσικάνη (πρωτεογλυκάνη θεικής χονδροϊτίνης) καθώς και άλλες πρωτεογλυκάνες έχει βρεθεί ότι βρίσκονται μαζί με λιποπρωτεΐνες σε αθηροσκληρωτικά τμήματα που έχουν απομονωθεί σε ανθρώπινες αορτές. Από τα συγκεκριμένα τμήματα έχουν ακόμη απομονωθεί μεγάλα σύμπλοκα πρωτεογλυκανών θεικής χονδροϊτίνης-λιποπρωτεϊνών [43]. Άλλες μελέτες έχουν ακόμη δείξει ότι οι λιποπρωτεΐνες δεσμεύονται σε πρωτεογλυκάνες θεικής χονδροϊτίνης μέσω των GAG αλυσίδων [44]. Και οι δύο GalAGs δεσμεύουν τις



χαμηλής περιεκτικότητας λιποπρωτεΐνες και τις συγκρατούν στο αρτηριακό τοίχωμα. Τα σύμπλοκα LDL-GAG αυξάνουν την ευαισθησία των λιποπρωτεϊνών σε *in vitro* οξείδωσή τους. Οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα, με αποτέλεσμα να παράγονται αφρώδη κύτταρα και να γίνεται εστιακή εναπόθεση λιπιδίων [45]. Οι υπερθειωμένοι διασακχαρίτες των GAG αλυσίδων παίζουν σημαντικό ρολό στην αλληλεπίδραση αυτή. Η CS-4 η οποία είναι κυρίως θειωμένη στη θέση 4 της γαλακτοζαμίνης (CS-4) καθώς και η CS-6 αλληλεπιδρούν με τον ίδιο τρόπο με τις LDL αλλά τα υπερθειωμένα τμήματα της CS είναι απαραίτητα για τη σύνδεση αυτή [46, 47]. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, τα σωματίδια των LDL που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για τις πρωτεογλυκάνες, είναι μικρότερα σε μέγεθος, υψηλότερης πυκνότητας και χαρακτηρίζονται από μικρότερο ποσοστό επιφανειακών λιπιδίων σε σχέση με τα λιπίδια του κορμού [48].

Η θειική χονδροϊτίνη που απομονώθηκε από δείγμα ανθρώπινης αορτής, είναι θειωμένη στη θέση 6 (C-6) σε ποσοστό 60-65%, στη θέση 4 (C-4) σε ποσοστό 20-25%, ενώ το υπόλοιπο 10-20% αναλογεί στη θειική δερματάνη [49]. Η απολιποπρωτεΐνη B (apo B) που περιλαμβάνει λιποπρωτεΐνες συζευγμένες με την C-6-S έχει απομονωθεί από ανθρώπινες αρτηρίες [45] και έχει δείχθει ότι η θέση δέσμευσης είναι τα κατάλοιπα 3359-3367 [50]. Αυτή η σύνδεση της C-6-S με την apo B εξαρτάται κατά πολύ από το λιπιδιακό περιβάλλον[51]. Μια πρόσφατη μελέτη έρχεται να δείξει ότι οι υποπληθυσμοί της IDL που δεσμεύονται σε C-6-S είναι πλούσιοι σε χοληστερινικούς εστέρες. Τα σωματίδια IDL που δεσμεύονται στην C-6-S είναι μικρότερα σε μέγεθος (26-28 nm diameter) και χαρακτηρίζονται από μικρότερο ποσοστό φωσφολιπιδίων και ελεύθερης χοληστερόλης ανά σωματίδιο IDL σε σύγκριση με τα μη δεσμευμένα σε C-6-S IDL σωματίδια [52].

Τα ασύνδετα σωματίδια περιέχουν όχι μόνο περισσότερα λιπίδια στην επιφάνειά τους ανά σωματίδιο αλλά περικλείουν και περισσότερα τριγλυκερίδια στον πυρήνα τους. Έτσι όταν εκφράζονται σαν αναλογία λιπιδίων επιφάνειας προς λιπίδια πυρήνα δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ αυτών των IDL σωματιδίων που δεσμεύονται στην CS και αυτών που δεν έχουν την παραπάνω ιδιότητα. Συνεπώς, όταν εκφράζονται ως ποσοστό επιφανειακών πολικών λιπιδίων έναντι των λιπιδίων του πυρήνα, δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των IDL σωματιδίων που δεσμεύουν ή όχι την CS. Επίσης πολύ σημαντικό είναι αυτό που προκύπτει από μια μελέτη σύμφωνα με την οποία, τα πυκνότερα IDL σωματίδια επιδεικνύουν μεγαλύτερη αντιδραστικότητα με τις πρωτεογλυκάνες που απομονώθηκαν από ανθρώπινο αρτηριακό τοίχωμα σε σύγκριση με την LDL και τα λιγότερο πυκνά IDL σωματίδια ενώ τα VLDL σωματίδια κατακρατούνται μερικώς. [53] Επιπρόσθετα, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι τα μεγαλύτερης πυκνότητας σωματίδια IDL αλληλεπιδρούν σε μεγαλύτερο ποσοστό με πρωτεογλυκάνες του αρτηριακού τοιχώματος, συγκριτικά με τις LDL και τα μικρότερης πυκνότητας σωματίδια IDL, ενώ τα VLDL σωματίδια συγκρατούνται ασθενώς. Σύμφωνα με άλλη μελέτη σε αθηροσκληρωτικές αορτές τύπου II, η αναλογία  $\Delta\delta\text{i-mono6S}/\Delta\delta\text{i-mono4S}$  ήταν αυξημένη και αυτή η αύξηση αντανακλά την ίδια αύξηση στην αναλογία CS/DS από τη στιγμή που η CS συντίθεται κυρίως από 6 θειωμένους δισακχαρίτες ενώ η DS συντίθεται κυρίως από μονάδες θειωμένες στη θέση 4. Αυτή η αύξηση της CS και της DS στην πρόιμη φάση της αθηροσκλήρωσης ίσως να διευκολύνει τη συσσώρευση της LDL στο αρτηριακό τοίχωμα [54]. Η κατεργασία των καλλιιεργειών με οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες και μετατρεπόμενο αυξητικό παράγοντα προωθεί την ένωση της βερσικάνης με τις λιποπρωτεΐνες [55]. Κατεργασία των καλλιιεργειών με οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη και αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού βελτιώνει τη δέσμευση της βερσικάνης στις

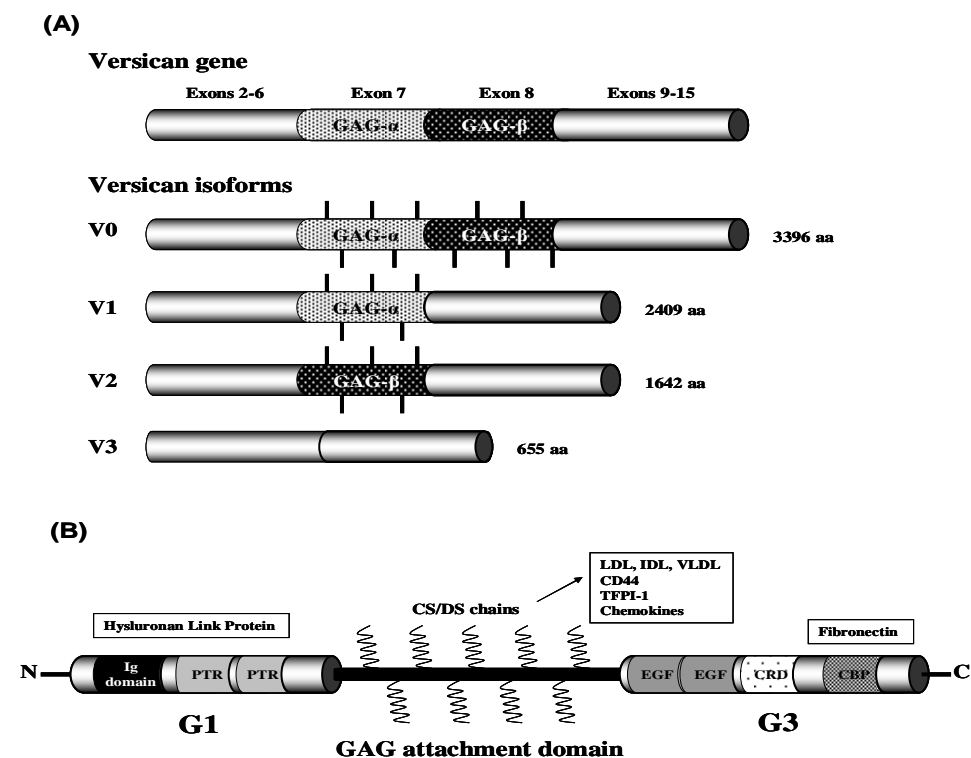
λιποπρωτεΐνες [55]. Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν κυρίαρχο συστατικό του αίματος και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία θρομβώσεων, όποτε η αλληλεπίδραση της βερσικάνης με τις λιποπρωτεΐνες θα μπορούσε να συμβάλλει αποφασιστικά στις διαδικασίες αυτές. Η βερσικάνη, αυτή η μεγάλη πρωτεογλυκάνη θειϊκής χονδροϊτίνης συντίθεται από λεία μυϊκά κύτταρα, συσσωρεύεται κατά την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και της επαναστένωσης και έχει αποδειχτεί ότι συνδέει τις LDL. Η βερσικάνη θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηρογένεσης. Αυτή η πρωτεογλυκάνη, έχει απομονωθεί σε πολύ μεγάλες ποσότητες από το αρτηριακό τοίχωμα και είναι μια υψηλού μοριακού βάρους πλούσια σε θειϊκή χονδροϊτίνη που συντίθεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα του έσω τοιχώματος των αρτηριών [56-61]. Αναλύσεις για τον προσδιορισμό της θέσης και του βαθμού θείωσης της CS στους ιστούς καταδεικνύουν αξιόπροσεκτη μεταβλητότητα ανάλογα με την ανατομική θέση, την ηλικία και την υποκείμενη παθολογική κατάσταση. Στο τοίχωμα των αγγείων η βερσικάνη συμβάλλει στο σχηματισμό των αγγείων και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό από τα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής [62] και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων [63].

*In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η βερσικάνη ρυθμίζει την προσκόλληση των λείων κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα και παίζει ρόλο στη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων. Οι αλυσίδες της CS της βερσικάνης αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες με κατάλοιπα D-γλυκουρονικού οξέος και N-ακετυλο-γαλακτοζαμίνης με O-θείωση στον C-4 και/ή στον C-6 του καταλοίπου γαλακτοζαμίνης. Τα αυξημένα ποσά της CS στις αθηροσκληρωτικές αορτές τύπου I, σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ίσως οφείλονται στα αυξημένα ποσά της βερσικάνης. Η βερσικάνη είναι μέλος των πρωτεογλυκανών που αλληλεπιδρούν με υαλουρονικό οξύ και των λεκτινών, και φέρουν αρνητικά

φορτία που επηρεάζουν την κατανομή των ιόντων και την ενυδάτωση του περικυτταρικού και εξωκυττάρου χώρου. Περίπου 15 αλυσίδες CS είναι ομοιοπολικά ενωμένες μέσω καταλοίπων σερίνης του πρωτεϊνικού σκελετού. [56]. Ως μέλος των πρωτεογλυκανών θεικής χονδροϊτίνης, η βερσικάνη συνιστάται από G1 τομέα στο αμινοτελικό άκρο, μία περιοχή δέσμευσης GAG και ένα G3 τομέα στο καρβοξυτελικό άκρο. Η G1 περιοχή συντίθεται από ένα μοτίβο τύπου ανοσοσφαιρίνης και δύο επαναλαμβανόμενες πρωτεογλυκανικές περιοχές. Ο G3 τομέας περιλαμβάνει δύο περιοχές ανάλογες του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και ένα μοτίβο σελεκτίνης (γνωστό σαν περιοχή αναγνώρισης υδρογονανθράκων) και ένα συμπληρωματικό μοτίβο τύπου δέσμευσης πρωτεΐνης [64]. Μεταξύ των περιοχών της σφαιρίνης υπάρχει μια μεγαλύτερο εκτεταμένο τμήμα που φέρει τις αλυσίδες της CS. Αυτές οι αλυσίδες πιστεύεται ότι εξυπηρετούν αντισυγκολλητικούς σκοπούς και κάνουν τη βερσικάνη ένα μόριο large space-filling το οποίο μπορεί να αντισταθεί στην πίεση της σφυγμικής ροής του αίματος [65,66,67]. Οι κεντρικές περιοχές δέσμευσης των GAG κωδικοποιούνται από εξόνια που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα.

Οι πρωτεΐνες του πυρήνα που μεταφράζονται από τις splice variants προβλέπεται να διαφέρουν κατά πολύ στο μήκος και στον αριθμό των αλυσίδων CS που είναι ενωμένες. Τα πρωτεϊνικά τμήματα που προκύπτουν από το μάτισμα φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά σε μήκος και σε αριθμό δεσμευμένων αλυσίδων CS. Αυτά τα ανάλογα είναι γνωστά ως V0 με aGAG και bGAG εξόνια, V1 με bGAG εξόνια, V2 με aGAG εξόνια και V3 με σφαιρικές περιοχές [68,69,70,71]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το V1 ισομερές εκφράζεται σε αρτηρίες in vivo και in vitro [72, 73]. Ο προσδιορισμός του RNA της βερσικάνης από λεία μυϊκά κύτταρα ποντικού με

υβριδισμό με εξειδικευμένους ιχνηθέτες έδειξε ότι τα ισομερή V0, V1, και V3 αντιπροσωπεύονται σε λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων [74] (σχήμα 7).



Σχήμα 7. Στο παραπάνω σχήμα απεικονίζεται η δομή του γονιδίου της βερσικάνης και των ισομερών V0, V1, V2 και V3 τα οποία εμπλέκονται σε τμήματα αθηρώματος (A). Τα ισομερή της βερσικάνης προκύπτουν από ανασυνδυασμό των GAG α και GAG β τμημάτων. Στο (B) αναπαριστάται το μοντέλο της βερσικάνης με τα σημεία σύνδεσης και τα πρωτεϊνικά τμήματα.

(**Ig domain:** immunoglobulin, **PTR:** proteoglycan tandem repeats, **EGF:** epidermal growth factor, **CRD:** carbohydrate recognition domain, **CBP:** complement binding protein-like motif).

Πηγή :*Karangelis et al. , Current Med. Chem., 2010 in press.*

Σε ασθενείς με αγγειακή νόσο η έκφραση της βερσικάνης και η συσσώρευσή της αυξάνεται σε μετά στεφανιογραφία και τοποθέτηση stent [75]. Αυξημένη έκφραση της βερσικάνης έχει παρατηρηθεί επίσης σε μυξωματώδους υφής πεπαχυμένο ενδοθήλιο, στην εξωκυττάρια ουσία περιοχών επαναστένωσης καθώς και στην αθηροσκληρωτική πλάκα και στην επιφάνεια των θρόμβων [76,77]. Σε προχωρημένα αθηροσκληρωτικά τμήματα, οι αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών της βερσικάνης που παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό θείωσης ίσως να προδιαθέτουν σε θρόμβωση διαταράσσοντας την οσμωτική λειτουργία και περιορίζοντας την αφθονία της αντιθρομβίνης [78]. Η βερσικάνη επίσης απελευθερώνεται στο κυκλοφορικό σύστημα αφού προηγηθεί αποικοδόμησή της. Οι μεταλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας ADAMTS (A Disintegrin And Metaloprotease with Thrombospondin repeats) και η πλασμίνη η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί σε αθηροσκληρωτικά τμήματα ή σε μη φυσιολογικές καταστάσεις, είναι γνωστό ότι διασπούν τη βερσικάνη καθώς και άλλα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας με αποτέλεσμα την απελευθέρωση θραυσμάτων της βερσικάνης στο πλάσμα [79,80]. Σύμφωνα με μια μελέτη τα θραύσματα της βερσικάνης που περιέχουν G3 είναι παρόντα στο πλάσμα και το G3 προκαλεί την συσσώρευση λευκοκυττάρων [81]. Μια πρόσφατη μελέτη [82] έχει καταδείξει ότι G3 θραύσματα τα οποία είναι σημαντικά μόρια που προάγουν την πήξη του αίματος μέσω σύνδεσης και καταστολής της λειτουργίας του TFPI-1, απελευθερώνονται στην ανευρυσματική διάταση αφού διασπαστούν από μεταλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας συμπεριλαμβανομένης και της βερσικάνης. Σε προχωρημένα αθηροσκληρωτικά τμήματα η ελαττωμένη θείωση των GAG αλυσίδων της βερσικάνης πιθανότατα προάγει τη θρόμβωση διακόπτοντας την οσμωτική ρύθμιση [83]. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι στο C-τελικό άκρο, ο G3 τομέας λειτουργεί ως μοτίβο δέσμησης της

ινονεκτίνης [84]. Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή G3, η φιβρονεκτίνη και ο ενδοθηλιακός αυξητικός αγγειακός παράγοντας (VEGF) δημιουργούν ένα σύμπλεγμα και η φιβρονεκτίνη καθορίζει τις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της σύνδεσης της με τον αυξητικό αυτό παράγοντα [82, 85]. Συμπερασματικά η βερσικάνη μέσω σύνδεσης με τη φιβρονεκτίνη επάγει τη διαδικασία της πήξης του αίματος σχηματίζοντας σύμπλοκα με τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας. Επιπλέον η G3 περιοχή δημιουργεί σύμπλοκα και προάγει τη συσσώρευση των λευκοκυττάρων [84]. Αυτός ίσως αποτελεί έναν άλλο μηχανισμό μέσω του οποίου η G3 περιοχή προάγει τη διαδικασία της πήξης και δυνητικά μπορεί να εξηγήσει πως η G3 ενισχύει την πήξη στο πλάσμα. Αυτό φαίνεται να είναι μοναδικό για τη G3 επειδή ακριβώς κατέχει πολλαπλούς μηχανισμούς με τους οποίους σχετίζεται με την πήξη. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη η βερσικάνη προωθεί την πήξη του αίματος μέσω της σύνδεσης της με το TFPI-1 καταστέλλοντας έτσι την ανασταλτική της δράση στην πήξη [82]. Άλλη πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι αναλύσεις αρτηριακών προτεογλυκανών CS (βερσικάνη) φυσιολογικών και αθηροσκληρωτικών τμημάτων ανέδειξαν ετερογενή σύνθεση που συμπεριλάμβανε δισακχαρίδια των CSA, CSC, CSB, and CSE. Μια σημαντική μείωση του ποσοστού των υπερθειωμένων τύπων (CSE), βρέθηκε σε μια ευπαθή πλάκα σε σχέση με τον γειτονικό υγιή ιστό [86]. Η CS στη μορφή της βερσικάνης από φυσιολογικές και αθηροσκληρωτικές αρτηρίες δομικά αντιστοιχεί σε υβριδικά GAG μόρια. Ο κύριος δισακχαρίτης ήταν ο μονοθειωμένος στη θέση 6 (C-6) της N-ακετυλογαλακτοζαμίνης. Υπερθειωμένες αλληλουχίες δισακχαριτών (κυρίως θειωμένες στη θέση 4 (C-4) ή 6 (C-6) της N-ακετυλογαλακτοζαμίνης) βρέθηκαν να αποτελούν το 11% του ολικού δισακχαρίτη σε βερσικάνη. Το κλειδί στην παρατήρηση είναι ότι η βερσικάνη σε προχωρημένα αθηροσκληρωτικά τμήματα βρίσκεται σε σημαντικά μειωμένα επίπεδα (μέχρι 68%) και περιέχει υπερθειωμένους

δισακχαρίτες στις GAGs [49,86]. Περαιτέρω κατανόηση των αλλαγών που υφίσταται η CS θα οδηγούσε αναμφισβήτητα στην εφαρμογή καλύτερων θεραπευτικών προοπτικών για τις θρομβωτικές επιπλοκές που δυνητικά μπορεί να επιφέρει η αθηροσκλήρωση.

### **Προσδιορισμός των GAG με ηλεκτροφόρηση**

Η ηλεκτροφόρηση για διαχωρισμό των GAG πραγματοποιείται σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης. Σε μια μελέτη, ο Contini και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν τις GAG με ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης με χρώση Alcian blue, πριν και μετά την κατεργασία με εξειδικευμένες λύσεις. Η ανάλυση GAG του πλάσματος υγιών ανδρών έδειξε την παρουσία της θειικής ηπαράνης I (33  $\mu\text{g/l}$ ), θειική ηπαράνη II (16  $\mu\text{g/l}$ ), θειική κερατάνη I (91  $\mu\text{g/l}$ ) και CS (189  $\mu\text{g/l}$ , 57% του συνολικού ποσού GAG). Ανάλυση των GAG του πλάσματος αθλητών έδειξε ότι η άθληση αλλάζει το ποσό και την εικόνα των GAG του πλάσματος [85].

Με συνδυασμό ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης, ενζυμική κατεργασία με χονδροϊτινάση ABC και HPLC ανάλυση, ο Imanari και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι οι GAGs σε πλάσμα κουνελιού αποτελούνται από μια ζώνη που μεταναστεύει γρήγορα (χαμηλής θείωσης CS-A με ποσοστό θείωσης 40%) και ένα συστατικό που μεταναστεύει αργότερα (χονδροϊτίνη). Ωστόσο, στην περίπτωση αιμοπεταλίων από κουνέλια, εμφανίστηκε μια ζώνη CS-A με ποσοστό θείωσης 90% στην ίδια θέση ως μια επιπλέον ζώνη από τις GAGs του ορού. Συνολικά, οι συγκεντρώσεις των  $\Delta\text{Di-nonS}$  ( $13.1 \pm 1.7 \mu\text{M}$ ) και  $\Delta\text{Di-mono6S}$  ( $1.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ) στο πλάσμα είναι σχεδόν ίδιες στον ορό ( $12.4 \pm 3.1 \mu\text{M}$  και  $1.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ), αλλά ο ορός περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση  $\Delta\text{Di-mono4S}$  ( $21.3 \pm 2.9 \mu\text{M}$ , 60.9% των συνολικών



δισακχαριτών) από το πλάσμα ( $11.5 \pm 2.1 \mu\text{M}$ , 45.1%). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η αύξηση της CS στον ορό κατά τη διάρκεια της πήξης του αίματος είναι σχεδόν ισοδύναμη με το ποσό της CS που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια του πλάσματος [85,87].

Μια μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης αναπτύχθηκε από τον Volpi με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της CS σε δείγματα ορού [87,88,89]. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.5% με 0.05 M 1,2-διαμινοπυριδίνης pH 9.0, η πλάκα αγαρόζης εμβαπτίστηκε σε cetyltrimethylammonium bromide και αφού στέγνωσε χρωματίστηκε με toluidine blue. Παρά το γεγονός ότι η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα δεν ήταν ικανοποιητικές, υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωση της CS στο πλάσμα είναι  $3.88 \pm 0.88 \mu\text{g/ml}$  και αυξάνεται σε  $12.7 \pm 4.7 \mu\text{g.ml}$  σε  $2.4 \pm 1.4 \text{ h}$  μετά από χορήγηση από το στόμα 4 g CS από βοοειδές [86]. Το γεγονός ότι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ανιχνεύει πολυσακχαρίτες με μοριακή μάζα μεγαλύτερη από 2000, αποδεικνύει ότι η εξωγενής CS που χορηγείται μέσω της στοματικής οδού εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος ως μόριο υψηλού μοριακού βάρους. Επιπλέον, αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν προηγούμενες παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες η δομή και το μοριακό μέγεθος των πολυσακχαριτών επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την απορρόφηση και τη βιοδιαθεσιμότητα μέσω της στοματικής οδού. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν ακόμα πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη CS μικρότερης μοριακής μάζας μετά από χορήγησή της.

## Προσδιορισμός των δισακχαριτών CS

Στη μελέτη αυτή οι Gags του ορού προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια θα αναφερθούν βασικές αρχές της μεθόδου που ακολουθήθηκαν κατά την πορεία του πρωτοκόλλου. Οι δισακχαρίτες που προέρχονται από τη CS μετά από ενζυμική κατεργασία με χονδροϊτινάση ABC και/ή AC μπορούν να καθοριστούν με διάφορες τεχνικές [90,91,92]. Συγκεκριμένα οι δισακχαρίτες της CS του αίματος έχουν προσδιοριστεί με HPLC, FACE και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Ο Volpi και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν τη δισακχαριτική σύσταση της CS με ισχυρή χρωματογραφία ανιοανταλλαγής σε στήλη με ομάδες trimethylammonioethyl, έκλουση με διαβαθμισμένη συγκέντρωση NaCl και ανίχνευση στα 232 nm. Δείχθηκε ότι η ενδογενής CS του πλάσματος έχει μέγιστη μοριακή μάζα 15630 και αποτελείται από 60% αθειώτους δισακχαρίτες, 3.5% Di-mono6S και 40% Di-mono4S. Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον καθορισμό των αλλαγών της δισακχαριτικής σύστασης της CS σε πλάσμα αίματος μετά από χορήγηση από το στόμα CS από βοοειδές και ιχθυικής προέλευσης [89]. Η CS από βοοειδές (Chondrosulf® IBSA) έχει μοριακή μάζα *ca* 25.000-30.000 και αποτελείται από Di-mono4S (55.0±5.0%), Di-mono6S (40.0±5.0%) και 5.0±2.0% αθειώτους δισακχαρίτες. Μετά από χορήγηση CS από βοοειδές 4 g, μετρήθηκε σημαντική μείωση στο σχετικό ποσό των αθειώτων δισακχαριτών που έφτασε το ελάχιστο σχετικό ποσοστό 22.96±11.68% στις 4 h. Την ίδια στιγμή οι ΔDi-mono4S δισακχαρίτες αυξήθηκαν με μέγιστο 60.50±10.45% στις 4 h και οι ΔDi-mono6S δισακχαρίτες, εμφανίστηκαν στο αίμα και έφτασαν την μέγιστη συγκέντρωση 17.33±6.52% στις 2 h [89].

Η CS ιχθυικής προέλευσης έχει μεγαλύτερο μοριακό μέγεθος από τη CS από βοοειδές και αποτελείται από Di-mono4S ( $31.1\pm 5.0\%$ ), Di-mono6S ( $50.0\pm 5.0\%$ ) και  $2.0\pm 2.0\%$  αθιώτους δισακχαρίτες και περίπου το 17% των διθειωμένων δισακχαριτών αποτελείται από ΔDi-di(2,6)S [93]. Μετά από χορήγηση της ιχθυικής CS μειώνεται το σχετικό ποσοστό των αθιωτών δισακχαριτών, φτάνοντας το  $30.86\pm 20.79\%$  σε 8 h. Παράλληλα, αυξάνονται οι ΔDi-mono4S δισακχαρίτες με μέγιστο  $51.91\pm 25.91\%$  σε 6 h και οι ΔDi-mono6S και διθειωμένοι δισακχαρίτες εμφανίζονται στο αίμα με μέγιστο  $15.24\pm 16,60\%$  στις 8 h και  $2.93\pm 4.82\%$  στις 12 h αντίστοιχα. Μετά από 48 h από τη χορήγηση του φαρμάκου η σύσταση των δισακχαριτών επανήλθε στη βασική. Η αργή προσρόφηση και η παρατεταμένη παρουσία της ιχθυικής CS στην κυκλοφορία του αίματος οφείλονται στην υψηλότερη μοριακή μάζα.

Πρόσφατα μια αξιόπιστη HPLC μεθοδολογία αναπτύχθηκε για τον διαχωρισμό των δισακχαριτών της CS του πλάσματος με στήλη C18 [94]. Χρησιμοποιήθηκε μια απλή πορεία κατεργασίας δείγματος που περιλάμβανε τη διαλυτοποίηση 500 μl πλάσματος με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4), θέρμανση στους 85°C για 3 min, ενζυμική κατεργασία με ABC και ανάκτηση των δισακχαριτών με φυγοκέντρηση σε φίλτρο με 3000 μέγιστο όριο μοριακού βάρους. Με ανίχνευση στα 232 nm, βρέθηκε ότι το ανθρώπινο πλάσμα περιέχει  $7.96\pm 0.46$  και  $2.48\pm 0.39$  μg/ml ΔDi-nonS και ΔDi-mono4S δισακχαρίτες, αντίστοιχα. Η ανάκτηση της CS σε δείγματα όπου είχε προστεθεί CS ήταν *ca* 70-75% και αυτό μπορεί να επηρεάζει την καθορισμένη εικόνα θείωσης της CS σε δείγματα πλάσματος.

Αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης των δισακχαριτών CS σε πλάσμα αίματος έχει επιτευχθεί με παραγωγολογία με dansylhydrazine [95,96] ή με αντίδραση των ακόρεστων δισακχαριτών με 2-cyanoacetamide σε αλκαλικό διάλυμα [97,98]. Στην

πρώτη περίπτωση, η συνολική αναλυτική διαδικασία ήταν απλή καθώς τα δείγματα πλάσματος (0.5 ml) υπέστησαν κατεργασία με ABC, οι δισακχαρίτες απομονώθηκαν με 25% trifluoroacetic acid σε αιθανόλη και στη συνέχεια μετά από παραγωγοποίηση με 1% dansylhydrazine σε αιθανόλη στους 40°C για 3 h, αναλύθηκαν με HPLC.

Η εφαρμογή FACE ηλεκτροφόρησης για τον καθορισμό της δισακχαριτικής σύστασης της CS του πλάσματος περιγράφηκε από τους Volpi και Maccari. Για την απομόνωση της CS του πλάσματος ακολουθήθηκε μια απλοποιημένη διαδικασία που περιλάμβανε κατεργασία με μία μη εξειδικευμένη προτεάση και απομόνωση της CS από 100 μl φυσιολογικού ανθρώπινου πλάσματος με ρητίνη ανιονανταλλαγής και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Οι τρεις αναγωγικές ομάδες των δισακχαριτών της CS παραγωγοποιήθηκαν με 2-αμνοακριδόνη (2-AMAC) με αναγωγική αμίνωση παρουσία κυανοβρωμιδίου. Με αυτή τη αναλυτική προσέγγιση, η CS του ανθρώπινου πλάσματος καθορίστηκε ποιοτικά και ποσοτικά σε επίπεδο μικρογραμμαρίων. Η μέση τιμή της ενδογενούς CS του πλάσματος, υπολογίστηκε  $4.44 \pm 1.26$  μg/ml πλάσματος και η πυκνότητα φορτίου ήταν  $0.54 \pm 0.024$ .

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό των δισακχαριτών CS μετά από κατεργασία με χονδροϊτινάση ABC σε διάφορα βιολογικά υγρά και ιστούς. Οι CE μεθοδολογίες που έχουν αναπτυχθεί έχουν περιγραφεί σε περιοδικά των Grimshaw και Lamari και συνεργατών το 2002 [99,100]. Ωστόσο, η CE δεν έχει εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό των δισακχαριτών της CS στο αίμα. Η μόνη μελέτη που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, αφορά το διαχωρισμό των  $\Delta\text{di-nonS}_{\text{HA}}$  και  $\Delta\text{di-nonS}_{\text{CS}}$  μετά από κατεργασία των GAG του αίματος με χονδροϊτινάση ABC. Ωστόσο, δεν παρέχονται πληροφορίες για τη συγκέντρωση της CS πιθανότατα εξαιτίας της αδυναμίας διαχωρισμού και ταυτοποίησης άλλων δισακχαριτών CS [101].

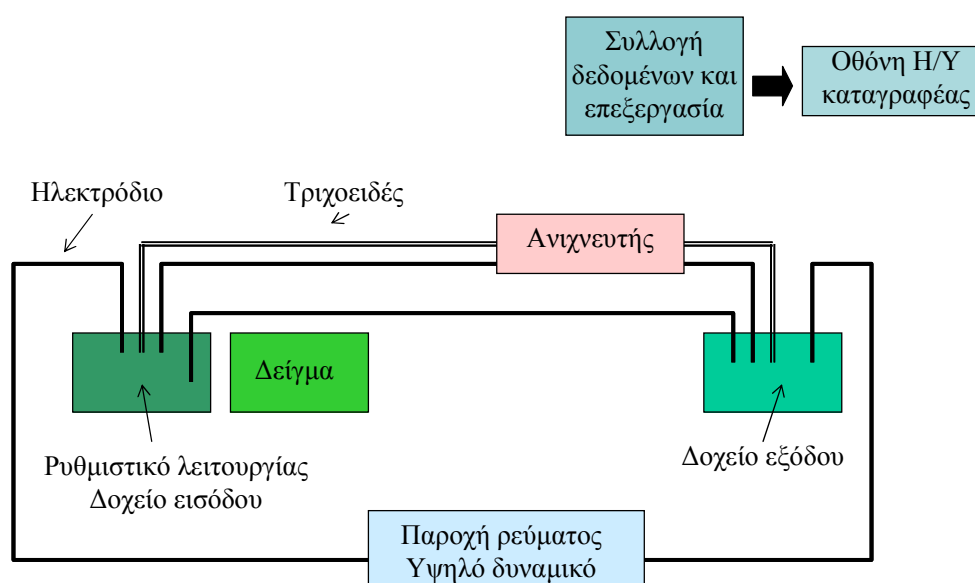
## Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση υψηλής επίδοσης (HPCE ή CE) είναι μια σύγχρονη και πολλά υποσχόμενη τεχνική διαχωρισμού, η οποία συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου PAGE και της χρωματογραφίας υψηλής επίδοσης HPLC. Στην CE, η ηλεκτροφόρηση επιτυγχάνεται σε ένα τριχοειδές στενής διαμέτρου (20-75  $\mu\text{m}$  i.d. ή ακόμα 10  $\mu\text{m}$  σε σύγχρονα συστήματα), το οποίο συνήθως γεμίζεται μόνο με το ρυθμιστικό διάλυμα λειτουργίας. Ο διαχωρισμός διευκολύνεται χρησιμοποιώντας υψηλό δυναμικό (10-30 kV) και υψηλά ηλεκτρικά πεδία (100-500 V/cm) κατά μήκος του τριχοειδούς. Με τον τρόπο αυτό παράγεται ηλεκτροσμωτική ροή (EOF) των ρυθμιστικών διαλυμάτων και ηλεκτροφορητική κινητικότητα (EM) των αναλυόμενων ειδών μέσα στο τριχοειδές. Η CE είναι μια ταχύτατα αναπτυσσόμενη τεχνική διαχωρισμού και αυτό οφείλεται στα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- 1) Μικρός χρόνος ανάλυσης,
- 2) Χρήση πολύ μικρής ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος (μερικά  $\mu\text{l}$ ) και δείγματος (1-50  $\text{nl}$ ) που την καθιστά φιλική στο περιβάλλον και ασφαλή για τον χειριστή λόγω της πολύ μικρής κατανάλωσης διαλυτών,
- 3) Βρίσκει εφαρμογή σε διάφορες κατευθύνσεις. Η CE θεωρείται ως η καταλληλότερη τεχνική για την ανάλυση σημαντικών βιολογικών μακρομορίων όπως αμινοξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ολιγονουκλεοτίδια, χειρόμορφες ενώσεις, βιταμίνες, εντομοκτόνα ανόργανα ιόντα, επιφανειοδραστικά μόρια, σωματίδια ιών αλλά και κύτταρα.

Η βασική οργανολογία της CE είναι απλή (Σχήμα 8). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με εφαρμογή υψηλού δυναμικού, σε ένα σύστημα που αποτελείται από

ένα τριχοειδές με τετηγμένο  $\text{SiO}_2$  το οποίο φέρει οπτικό ένα παράθυρο κοντά στο άκρο του, από παροχή υψηλού δυναμικού, από δύο ηλεκτρόδια τοποθετημένα στις δεξαμενές ρυθμιστικού και δείγματος και τέλος από μια μονάδα ανιχνευτή που έχει συνδεθεί με μια συσκευή συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων.



Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση της οργανολογίας της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.

Η πορεία που ακολουθείται για την ανάλυση των δειγμάτων αφορά το γέμισμα του τριχοειδούς με ρυθμιστικό διάλυμα και την εισαγωγή του δείγματος με αυτόματο βύθισμα του άκρου του τριχοειδούς στο διάλυμα του δείγματος. Η ένεση του δείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους: είτε υδροστατικά (υπό κενό ή πίεση) ή ηλεκτροκινητικά εφαρμόζοντας διαφορά δυναμικού. Ακολουθώντας την εφαρμογή δυναμικού τα μόρια θα κινηθούν σύμφωνα με την καθαρή κινητικότητα:  $\text{EOF} \pm \text{EM}$ . Η μετακίνηση των μορίων με διαφορετικές ταχύτητες, διαμέσου του τριχοειδούς, έχει σαν αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των προς ανάλυση ειδών.

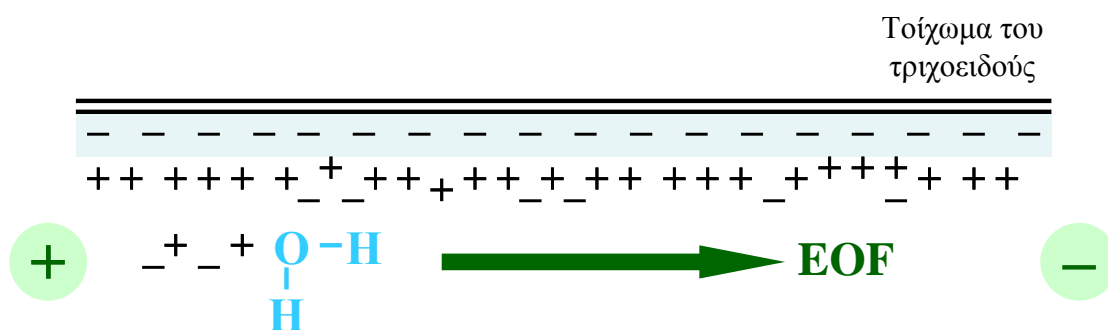
Γενικά στον μηχανισμό της μετακίνησης των προς ανάλυση ειδών στην CE επιδρούν οι παρακάτω παράγοντες:

- 1) Η EOF του ρυθμιστικού διαλύματος, η οποία θεωρείται ως η κινητήρια δύναμη στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση,
- 2) Η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου και
- 3) Το καθαρό φορτίο, το μοριακό βάρος και το σχήμα του μορίου.

Η EOF είναι συνέπεια του φορτισμένου  $\text{SiO}_2$  που βρίσκεται στο εσωτερικό του τριχοειδούς και το οποίο φέρει αρνητικό φορτίο σε  $\text{pH} > 1.5$  (pI των σιλανομάδων  $\sim 1.5$ ). Το αρνητικό φορτίο έλκει κατιόντα από το ρυθμιστικό διάλυμα λειτουργίας οδηγώντας στον σχηματισμό μιας ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας. Εφαρμογή διαφοράς δυναμικού οδηγεί τα κατιόντα που διαχέονται στο τριχοειδές προς το αρνητικό άκρο (κάθοδος) παρασέρνοντας μόρια νερού (Σχήμα 9). Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που ρυθμίζουν την EOF και είναι: (1) η τροποποίηση του τριχοειδούς, (2) η αλλαγή των χαρακτηριστικών του ρυθμιστικού διαλύματος λειτουργίας (pH, συγκέντρωση, προσθήκη τροποποιητή), (3) η αλλαγή του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται, και (4) η ρύθμιση της θερμοκρασίας.

Η συγκέντρωση των κατιόντων υδρογόνου του ρυθμιστικού διαλύματος λειτουργίας επηρεάζει σημαντικά την EOF. Σε υψηλές τιμές pH το αρνητικό φορτίο του τριχοειδούς αυξάνεται, και έτσι η EOF επιτυγχάνεται σε pH 4-8. Αλλαγή του pH από 9.0 σε 3.0 έχει σαν αποτέλεσμα να μετρηθεί ροή όγκου 8 φορές μικρότερη ανά  $\text{nl/sec}$ . Μία από τις πιο βολικές και εύκολα εφαρμόσιμες μεθόδους με την οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την EOF, είναι η διόρθωση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος λειτουργίας. Απαιτείται όμως μεγάλη προσοχή προκειμένου να μην μεταβληθεί δομικά ο διαλύτης. Αλλαγή της ισχύος του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί

ανάλογη αλλαγή της EOF, αλλά και μείωση της ικανότητας για ανάλυση. Αυξάνοντας την συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος λειτουργίας (ιονική ισχύς), μειώνονται το δυναμικό Z και η EOF. Για την ιονική ισχύ, πρέπει να επιτευχθεί μεγαλύτερη ισορροπία διότι υψηλή ιονική ισχύς οδηγεί στη δημιουργία υψηλής τιμής ρεύματος και θερμότητας Joule, ενώ χαμηλή ιονική ισχύς μπορεί να προκαλέσει απορρόφηση του δείγματος στο τριχοειδές. Οι συνήθεις τιμές του ρυθμιστικού διαλύματος κυμαίνονται από 10 έως 50 mM.



Σχήμα 9. Αναπαράσταση του εσωτερικού του τριχοειδούς και δημιουργία ηλεκτροσμωτικής ροής στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης. Οι ομάδες της σιλανόλης στο τριχοειδές φορτίζονται αρνητικά σε  $\text{pH} > 1.5$  και έλκουν κατιόντα από το ρυθμιστικό διάλυμα, σχηματίζοντας μια διπλοστοιβάδα. Η κίνηση των κατιόντων έπειτα από εφαρμογή δυναμικού έχει ως αποτέλεσμα μια συνεχή ροή προς το αρνητικό άκρο, η οποία παριστάνεται με το βέλος της EOF.

Η EOF μπορεί επίσης να τροποποιηθεί χρησιμοποιώντας πρόσθετα ρυθμιστικού, τα οποία μπορούν να μειώσουν, να αυξήσουν ή να αντιστρέψουν το φορτίο της επιφάνειας και συνεπώς την EOF. Στο ρυθμιστικό διάλυμα όταν προστίθενται



επιφανειοδραστικά μόρια, απορροφώνται στο τοίχωμα του τριχοειδούς διαμέσου υδροφοβικών ή/και ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Ανιονικά επιφανειοδραστικά μόρια μπορούν να αυξήσουν την EOF, ενώ κατιονικά επιφανειοδραστικά μόρια μπορούν να την μειώσουν ή να την αναστρέψουν. Επικάλυψη των τοιχωμάτων του τριχοειδούς με χημικό τρόπο μπορεί να τροποποιήσει την πολικότητα ή/και το φορτίο του τοιχώματος, γεγονός το οποίο εξαρτάται από το χημικό αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε. Η θερμοκρασία μπορεί επίσης να επιδράσει διότι προκαλεί αλλαγή 2-3% ανά °C στο ιξώδες του ρυθμιστικού. Οι περισσότεροι διαχωρισμοί επιτυγχάνονται στους 25°C.

Η πραγματική ταχύτητα μετανάστευσης των μορίων προκύπτει από το διανυσματικό άθροισμα των EOF και EM. Η καθαρή μετανάστευση σαφώς επηρεάζεται από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αφού η EOF και το φορτίο κάθε ιονιζόμενης ένωσης εξαρτάται από το pH. Για ένα μίγμα πεπτιδίων σε  $pH > pI$ , το φορτίο του κάθε πεπτιδίου είναι αρνητικό. Εντούτοις, η EOF υπερνικά την EM και έτσι το πεπτίδιο μεταναστεύει προς το αρνητικό άκρο. Σε  $pH < pI$  το φορτίο του πεπτιδίου είναι θετικό,  $EOF < EM$ , οπότε η καθαρή μετανάστευση θα είναι ίση με  $EOF + EM$  και το πεπτίδιο θα οδηγείται επίσης στο αρνητικό ηλεκτρόδιο. Σε  $pH = pI$  το καθαρό φορτίο του πεπτιδίου είναι μηδέν και έτσι η καθαρή μετακίνηση θα είναι ίση με την EOF ( $EM = 0$ ), οπότε το πεπτίδιο θα κινείται προς το αρνητικό άκρο.

## Τύποι CE και εφαρμογές τους

Υπάρχουν 6 διαφορετικοί τρόποι λειτουργίας στην CE. Ο μηχανισμός διαχωρισμού στην κάθε περίπτωση είναι διαφορετικός. Έτσι ταξινομούνται ως εξής:

- 1) Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE) ή CE ελεύθερου διαλύματος (FSCE),
- 2) Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης (CIEF),
- 3) Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση γέλης (CGE) ή τριχοειδής ηλεκτροφόρηση με μοριακά κόσκινα (SCE),
- 4) Τριχοειδής ισοταχοφόρηση (CITP),
- 5) Μικυλλιακή ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία (MEKC ή MECC),
- 6) Τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία (CEC),
- 7) Ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία μικρογαλακτώματος (MEEKC).
- 8) Η βάση του διαχωρισμού των διαφόρων τύπων CE αναφέρεται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2.** Οι διαφορετικοί τύποι της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και οι μηχανισμοί διαχωρισμού τους

Τύπος CE	Βάση του διαχωρισμού
CZE	Μετανάστευση των διαλυμένων ουσιών με βάση την αναλογία φορτίο/μάζα
CIEF	Διαφορές στα ισοηλεκτρικά σημεία (ακόμα <math><0.005</math> μονάδες)
CGE	Διαφορές στο μέγεθος και στο σχήμα
CITP	Διαφορετικά κινούμενα «boundaries»
MECC	Αλληλεπιδράσεις των διαλυμένων ουσιών (υδροφοβικές ή ιονικές) με μικύλλια
CEC	Διαχωρισμός χρησιμοποιώντας μαζί ηλεκτροφόρηση και χρωματογραφία
MEEKC	Αλληλεπιδράσεις των προς διαχωρισμό ενώσεων με μικρογαλάκτωμα

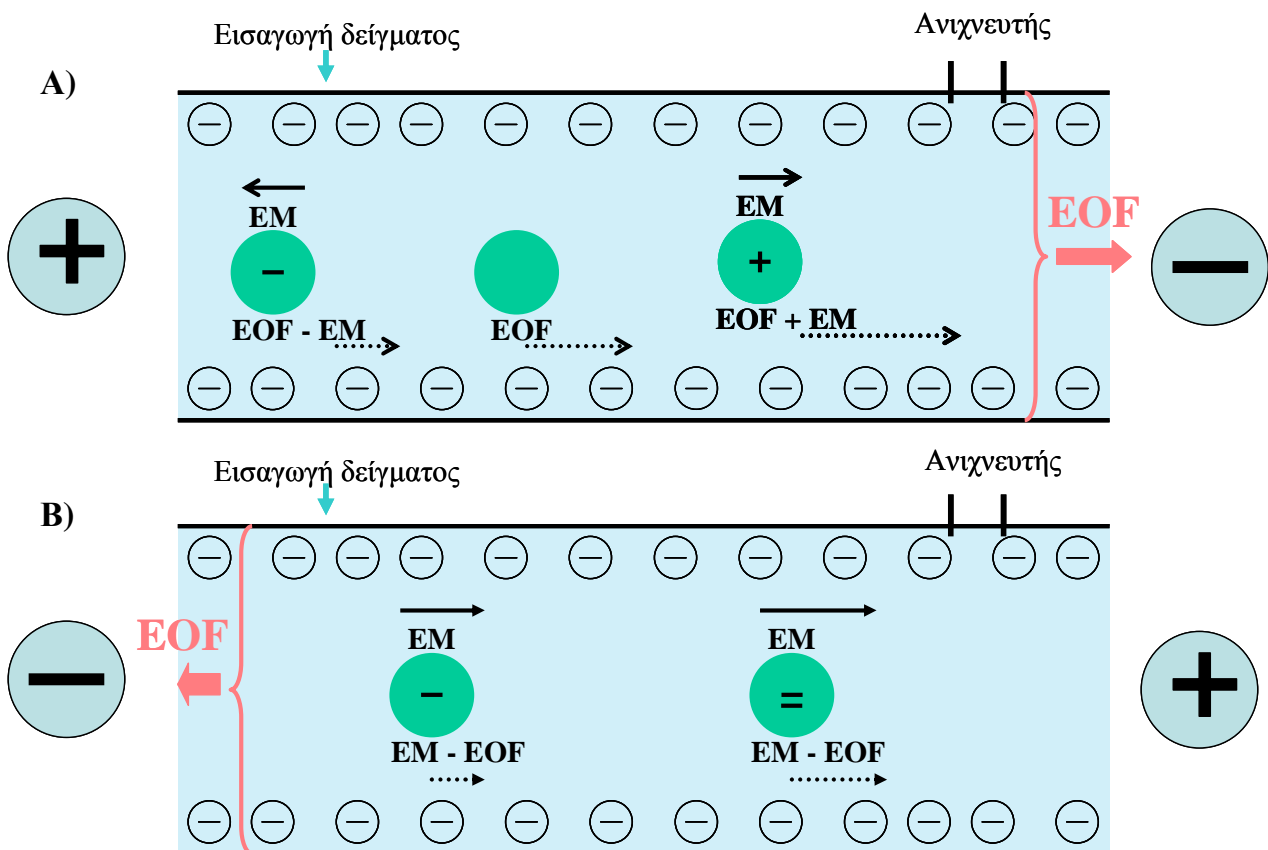
## Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης

Η CZE αποτελεί τον απλούστερο τύπο τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης CE, οπότε είναι και η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη. Ο μηχανισμός διαχωρισμού βασίζεται στις διαφορές της πυκνότητας φορτίου (φορτίο/μάζα). Το τριχοειδές γεμίζεται μόνο με το ρυθμιστικό διάλυμα και τα διαλύματα που πρόκειται να διαχωριστούν μεταναστεύουν με διαφορετικές ταχύτητες δημιουργώντας ευδιάκριτες ζώνες. Ανιονικά, κατιονικά και ουδέτερα είδη μπορούν εύκολα να διαχωριστούν με την CZE λόγω των διαφορετικών κινητικότητων ( $EOF \pm EM$ ). Το ρυθμιστικό διάλυμα λειτουργίας στην CZE είναι δραστικό όταν  $pH \sim pI$  ή  $pKa \pm 1-2$ , ενώ η ιονική ισχύς είναι ανάλογη με την αγωγιμότητα.

Δύο διαφορετικά είδη CZE έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ουδέτερων και φορτισμένων ειδών. Το πρώτο και πιο κοινό, η κανονική πολικότητα. Τα δείγματα εισάγονται από το θετικό ηλεκτρόδιο (άνοδος), διαχωρίζονται σε ένα αλκαλικό ή ουδέτερο ρυθμιστικό λειτουργίας, οδηγούνται στο αρνητικό άκρο από την EOF και τέλος ανιχνεύονται εκεί (Σχήμα 4).

Το δεύτερο είδος, γνωστό ως ανάστροφη πολικότητα, χρησιμοποιείται όταν η EOF είναι ανεπαρκής να υπερνικήσει την EM. Το ρυθμιστικό λειτουργίας που χρησιμοποιείται είναι όξινο ( $pH = 3 \pm 1$ ). Σε αυτό το χαμηλό pH, ο βαθμός ιονισμού των ομάδων σιλανόλης στο τοίχωμα του τριχοειδούς είναι μικρότερος και κατά συνέπεια υπάρχει καταστολή της EOF. Η κυρίαρχη δύναμη σε αυτό το διαχωρισμό είναι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των ιόντων, EM. Τα δείγματα – μόνο ανιονικά είδη – εισάγονται στην κάθοδο και ανιχνεύονται στον θετικό πόλο (Σχήμα 3B). Η ανάστροφη πολικότητα έχει κυρίως χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των όξινων υδατανθράκων, και ειδικότερα για τους ακόρεστους δισακχαρίτες που προέρχονται

από γλυκοζαμινογλυκάνες [102,103,104]. Το δυναμικό της ηλεκτροφόρησης είναι ένας σπουδαίος παράγοντας ο οποίος συνεισφέρει στην ανάλυση. Υψηλά δυναμικά αυξάνουν την EOF, οπότε και ο χρόνος ανάλυσης μειώνεται. Επιπρόσθετα, υψηλά δυναμικά προάγουν τη διαδικασία της ανάλυσης. Όμως, πολύ υψηλές τιμές δυναμικών έχουν σαν αποτέλεσμα να παράγεται θερμότητα Joule και ως συνέπεια, τη διεύρυνση ζώνης, η οποία μειώνει την αναλυτική ικανότητα. Από την άλλη μεριά, πολύ χαμηλά δυναμικά έχουν σαν αποτέλεσμα μικρούς χρόνους μετανάστευσης και ζώνες διεύρυνσης, λόγω αυξημένης διάχυσης. Για να επιτευχθεί το κατάλληλο δυναμικό θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι το μέγιστο εφαρμοζόμενο δυναμικό οδηγεί στη γραμμική σχέση ανάμεσα στο δυναμικό και το ρεύμα.



**Σχήμα 4.** Μετακίνηση των ουδέτερων και φορτισμένων υδατανθράκων στη CZE χρησιμοποιώντας A) αλκαλικό ή ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα λειτουργίας και

κανονική πολικότητα και β) μικρού pH όξινο ρυθμιστικό διάλυμα και ανάστροφη πολικότητα. Στην κανονική πολικότητα τα είδη μετακινούνται προς την κάθοδο, ενώ στην ανάστροφη πολικότητα προς την άνοδο .

### **Ανάλυση γλυκοζαμινογλυκανών με CZE**

Οι GAGs είναι πολυανιόντα και στις περισσότερες περιπτώσεις η ανιονική φύση διατηρείται και μετά από ενζυμική κατεργασία. Αυτό σημαίνει ότι η EM των όξινων υδατανθράκων και η EOF του διαλύτη θα έχουν αντίθετες κατευθύνσεις όσο αυτά τα ιόντα είναι υπό διάσταση. Οι GAGs και τα τμήματά τους μπορούν να ηλεκτροφορηθούν και σε υψηλό και σε χαμηλό pH, χρησιμοποιώντας κανονική και ανάστροφη πολικότητα, αντίστοιχα. Η προσθήκη βορικών σε αλκαλικό pH μπορεί να βελτιώσει το διαχωρισμό των ισομερών υδατανθράκων. Σε όξινο pH, οι καρβοξυλομάδες πρωτονιώνονται, το pK βρίσκεται κοντά στο 3, αλλά με τις περιοχές pH που χρησιμοποιούνται (συνήθως 2.5 και 5.0), οι θεικές ομάδες είναι πάντα φορτισμένες. Τα ουρονικά οξέα των GAGs IdoA και GlcA, έχουν ελαφρώς διαφορετικά pK και αυτή η τιμή μπορεί να ποικίλει, εξαρτώμενη από το άμεσο περιβάλλον (παρουσία θεικών, γλυκοζιδικών δεσμών, κτλ). Έτσι, οι τιμές pH γύρω στο 3 μπορούν να προκαλέσουν διαφορές στη μετακίνηση ποικίλων ισομερών. Η χρήση ελαφρά όξινου pH επίσης φαίνεται να δίνει καλύτερο σχήμα κορυφής αυτών των ενώσεων [105].

Ανιχνευτές με ποικίλα μήκη κύματος έχουν, γενικά, καλύτερη ευαισθησία από ότι οι ανιχνευτές διοδικής λυχνίας, οι οποίοι όμως μπορεί να χρησιμοποιηθούν για πιο πολύπλοκες αναλύσεις. Στην πράξη, δύο δομές των GAGs χρησιμοποιούνται για UV ανίχνευση: η *N*-ακετυλομάδα και ο γλυκοζιτικός δεσμός, απορροφώντας σε χαμηλά

μήκη κύματος (185-215 nm), και το  $\Delta^{4,5}$ -ουρονικό οξύ που σχηματίζεται μετά από ενζυμική διάσπαση των GAGs με οποιαδήποτε από τις ειδικές λυάσες απορροφώντας στα 232 nm με υψηλό συντελεστή απορρόφησης  $\sim 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [105].

### **HPCE μέθοδοι-Προσδιορισμός δισακχαριτών CS**

Τα δείγματα που αναλύθηκαν, αφού είχαν υποστεί κατεργασία με χονδροϊτινάσες ABC/AC II, περιελάμβαναν διαλύματα θεικής χονδροϊτίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων, ορό αίματος, ορός αίματος που περιείχε  $\Delta$ -δισακχαρίτες θεικής χονδροϊτίνης και ορό αίματος που περιείχε θεική χονδροϊτίνη. Η ανάλυση με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση έγινε σε συσκευή HP<sup>3D</sup>CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) η οποία είχε ενσωματωμένο ανιχνευτή διοδικής λυχνίας (diode array detector). Η ανίχνευση των  $\Delta$ -δισακχαριτών θεικής χονδροϊτίνης έγινε στα 232 nm. Για την ανάλυση, το διαχωρισμό και την ανίχνευση στο UV των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε τριχοειδές που περιέχει τετηγμένη  $\text{SiO}_2$  και έχει τα εξής χαρακτηριστικά: 50  $\mu\text{M}$  i.d., 64.5 cm συνολικό μήκος και 56 cm αποτελεσματικό μήκος. Οι αναλύσεις έγιναν στους 25°C, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών, pH 3.00 και τάση 30 kV. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποστειρώθηκε χρησιμοποιώντας φίλτρο με πορώδες 0.2  $\mu\text{M}$ . Η εισαγωγή των δειγμάτων έγινε στην κάθοδο, υπό πίεση (50 mbar  $\times$  10 sec) και οι ακόρεστοι  $\Delta$ -δισακχαρίτες μετακινήθηκαν από το αρνητικό προς το θετικό ηλεκτρόδιο, λόγω της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας (EM) και αντίθετα στην ηλεκτροσμωτική ροή (EOF) του ρυθμιστικού διαλύματος. Πριν από κάθε έγχυση δείγματος πραγματοποιείται έκπλυση του τριχοειδούς με ρυθμιστικό διάλυμα λειτουργίας για 5 min ενώ μετά την ανάλυση πραγματοποιείται έκπλυση με 0.1M NaOH για 2 min και

dH<sub>2</sub>O για 3 min. Η ποσοτικοποίηση των περιεχομένων Δ-δισακχαριτών των δειγμάτων θεικής χονδροϊτίνης από διάφορες φυσικές πηγές προέλευσης επιτεύχθηκε μέσω επεξεργασίας των γραμμικών γραφικών παραστάσεων μιγμάτων Δ-δισακχαριτών. Τα πρότυπα διαλύματα Δ-δισακχαριτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: διάλυμα με μίγμα των Δdi-triS, Δdi-SD, Δdi-SB και Δdi-SE και διάλυμα με μίγμα των Δdi-mono6S, Δdi-mono4S και Δdi-nonS σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 5-300 μg/ml.

# *ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ*

## **ΣΚΟΠΟΣ**

Η θειϊκή χονδροϊτίνη είναι γλυκοζαμινογλυκάνη που τα τελευταία χρόνια βρίσκεται στο στόχαστρο τόσο της βιοχημείας όσο και της ιατρικής αφού φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης. Σκοπός λοιπόν, της παρούσης διδακτορικής διατριβής ήταν ο προσδιορισμός της θειϊκής χονδροϊτίνης και του υαλουρονικού οξέος στον ορό του αίματος ασθενών που νοσηλεύθηκαν στην Πανεπιστημιακή Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς-Αγγείων-Θώρακα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και οι οποίοι έπασχαν από στεφανιογραφικά επιβεβαιωμένη στεφανιαία νόσο, καθώς επίσης και η αποσαφήνιση του μοντέλου μεταβολής των τιμών αυτής σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη.



## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### **Εθελοντές-ασθενείς**

Αρχικά μελετήθηκαν τα δείγματα 18 υγιών εθελοντών (8 γυναίκες και 10 άνδρες) με ηλικιακό εύρος 19-67 έτη, μέση ηλικία τα 40 έτη, χωρίς ιστορικό στηθάγχης και χωρίς κανένα αθηροσκληρωτικό παράγοντα κινδύνου στο ιστορικό τους (υπέρταση, παχυσαρκία, υπερλιπιδαιμία, κάπνισμα, θετικό οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου), (κριτήρια αποκλεισμού) (**ομάδα Α**). Η παραπάνω ομάδα δεν ελάμβανε κανένα φαρμακευτικό σκεύασμα.

Στην επομένη φάση επιλέχθηκαν 40 ασθενείς της Χειρουργικής Κλινικής Καρδιάς-Αγγείων-Θώρακα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας οι οποίοι έπασχαν από στεφανιογραφικά επιβεβαιωμένη στεφανιαία νόσο και επρόκειτο να υποβληθούν σε εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (**ομάδα Β**). Οι ασθενείς ελάμβαναν στατίνες, αντιυπερτασικά (b blockers) και ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους μέχρι και 2 ημέρες πριν από την εγχείρηση. Από τους ασθενείς αυτούς οι 25 ήταν άνδρες και 15 γυναίκες. Πιο συγκεκριμένα στην παραπάνω ομάδα (ομάδα Β), το ηλικιακό εύρος των ασθενών ήταν 44-86 έτη και η μέση ηλικία τα 66 έτη.

Οι ασθενείς της Β ομάδας προεγχειρητικά και μετεγχειρητικά (3<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα) υποβλήθηκαν σε αιμοληψία και με τις τιμές των προεγχειρητικών μετρήσεων πραγματοποιήθηκε αρχικά προσδιορισμός του βιοχημικού-αθηροσκληρωτικού τους προφίλ μετρώντας τους παράγοντες ολική χοληστερίνη, τριγλυκερίδια, απολιποπρωτεΐνη Α (ApoA), απολιποπρωτεΐνη Β (ApoB), HDL και LDL.

Η εγχείρηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας (on pump). Τέλος, η θειϊκή χονδροϊτίνη προσδιορίστηκε και σε μια τρίτη ομάδα ασθενών

(ομάδα Γ) που υπεβλήθησαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη χωρίς τη βοήθεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας (off pump). Η ομάδα Γ συμπεριέλαβε 10 ασθενείς, 6 άνδρες και 4 γυναίκες, με ηλικιακό εύρος ασθενών τα 39-69 έτη και μέση ηλικία τα 58 έτη. Παρακάτω αναφέρονται τα επιμέρους πρωτοκόλλα που ακολουθήθηκαν.

### **Εξωσωματική κυκλοφορία**

Η μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν Stockert SIII, 1997. Ο οξυγονωτής ήταν Terumo SX18 R, Affinity, Quadrox (Jostra), Dideco Evo. Το σετ σωλήνων εξωσωματικής ήταν Caston Pack: Comb/Sorin-Medtronic. Οι αρτηριακές κάνουλες ήταν Jostra 6,7 mm, 20 French, ενώ οι φλεβικές (two stage 34/39 Jostra). Για Vent χρησιμοποιήθηκε 12 French Terumo, ενώ για την καρδιοπληγία χρησιμοποιήθηκε σετ καρδιοπληγίας με εναλλάκτη θερμοκρασίας (4/1): Medos, Eurosets, Sorin. Το καρδιοπληγικό διάλυμα ήταν αιματική καρδιοπληγία καλίου (Calafiore). Το φίλτρο αιμοδιήθησης ήταν Jostra ενώ η κατώτερη θερμοκρασία ήταν 32-33 βαθμοί Κελσίου.

### **Αναισθησιολογικό πρωτόκολλο**

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για εισαγωγή του ασθενούς στην αναισθησία ήταν :

- 1.Μιδαζολάμη με συνήθη δόση τα 3-5 mg ρυθμιζόμενη ανάλογα με την καρδιακή λειτουργία.
2. Fentanyl 100-150 µg.
- 3.Ετομιδάτη 10-20 mg.
4. Φεκουρόνιο 75 mg.

Κατόπιν ο ασθενής διασωληνωνόταν και ακολουθούσε η τοποθέτηση κεντρικών φλεβικών γραμμών. Η αναισθησία διατηρούνταν με Sevoflurane 0,4-1% μέχρι την τοποθέτηση του καθετήρα Swan-Ganz. Στη συνέχεια χορηγούνταν η προποφόλη και ριμιφεντανίλη σε δόσεις 4-5 mg/kg ΒΣ/h και 0,1 μg/kgΒΣ/min αντίστοιχα. Τα υγρά (κρυσταλλοειδή- κολλοειδή) και το αίμα χορηγούνταν ανάλογα με την καρδιακή λειτουργία και τις απαιτήσεις του χειρουργείου.

### **Βιοχημικό πρωτόκολλο**

Όλα τα δείγματα ολικού αίματος φυγοκεντρήθηκαν και οι βιοχημικές παράμετροι προσδιορίστηκαν στον ορό με τη βοήθεια του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Ο τύπος του αναλυτή που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να επεξεργαστούν τα δείγματα και να ληφθούν οι μετρήσεις των βιοχημικών παραμέτρων ήταν Olympus AV 2700 του οποίου η λειτουργία βασίζεται στη φωτομετρία. Για τον προσδιορισμό κάθε βιοχημικής παραμέτρου χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ρυθμιστικά διαλύματα:

1. Για την **ολική χοληστερόλη**: phosphate buffer, 4-aminoantipyrine, peroxidase, phenol, cholesterol esterase, cholesterol oxidase καθώς επίσης και συντηρητικά.
2. Για τον προσδιορισμό των **τριγλυκεριδίων** χρησιμοποιήθηκαν 2 διαλύματα εκ των οποίων το πρώτο διάλυμα περιέχει Pipes buffer, magnesium acetate, MADP, AYP, glycerokinase bac, stearo-thermophilus, peroxidase-horseradish, lipase-pseudomonas species, ascorbate oxidase-curcubitaspecies και απολυμαντικό. Το δεύτερο διάλυμα αποτελείτο από 4-aminoantipyrine, glycerol phosphate oxidase and pseudomonas καθώς και συντηρητικά.

3. Για τον προσδιορισμό της **HDL** χρησιμοποιήθηκε i) antihuman B-lipoprotein antibody, 4-aminoantipyrine, good's buffer, peroxidase, ascorbate oxidase, detergent, με συντηρητικά ii) Cholesterol oxidase, cholesterol esterase, good's buffer, F-Daos, και απολυμαντικό.
4. Για τον προσδιορισμό της **LDL** χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος  
 $LDL = CHOL - HDL - TRIGLYCERIDES / 5$ .
5. Για τον προσδιορισμό των ApoA και ApoB λιποπρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι διαλύματα:
  - i) **ApoA**: α. Tris buffer, polyethylene glycol 6000, also contains preservatives.  
β. Goat anti-Apo A1 antiserum.
  - ii) **ApoB**: α. Tris buffer, polyethylene glycol 6000, με συντηρητικά.  
β. Goat anti-ApoB antiserum, tris buffer

### **Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση**

Για την εφαρμογή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Το δείγμα ορού κατεργάζεται αρχικά overnight με μία γενική πρωτεάση σε pH 8.00 ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl . Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη NaCl 0.6M και βρασμός για 1 min. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ακολουθεί κατακρήμνιση με EtOH/AcONa για 2h στους 4C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και το ίζημα διαλυτοποιείται σε διάλυμα Tris-HCl με pH 7.5 και υφίσταται ενζυμική κατεργασία με εξειδικευμένες χονδροϊτινάσες ABC/AC II. Μετά από 3 h η αντίδραση τερματίζεται με βρασμό και το διάλυμα αναλύεται με CE.

Όλες οι αναλύσεις με τη μέθοδο της capillary electrophoresis πραγματοποιήθηκαν στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών.

## Στατιστική ανάλυση

Στους πίνακες 2, 3, 4 έχουν υπολογιστεί περιγραφικές μετρήσεις όπως mean, std. deviation, median, min, max. Οι παράγοντες CS, CS4 και CS0 του πίνακα 2 και pre-post CS4, pre-post CS0, pre-post CS του πίνακα 3 συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το matched paired Wilcoxon test. Στον πίνακα 5 η γραμμική συνάρτηση (Linear regression) χρησιμοποιήθηκε για να αναδείξει τη σχέση της ανεξάρτητης μεταβλητής (post CS) σε συνάρτηση με τους ακόλουθους παράγοντες pre CS, LDL, HDL, APOA, APOB, TG, CHOL. Για τη σύγκριση των βιοχημικών-αθηροσκληρωτικών προφίλ των ομάδων Β και Γ στον πίνακα 6 και τη σύγκριση των τιμών της CS μεταξύ των ίδιων ομάδων στον πίνακα 7 χρησιμοποιήθηκε το Mann Whitney U test. Το αποτέλεσμα θεωρούνται στατιστικώς σημαντικά όταν το  $p < 0.05$ . Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του SPSS v. 13.0.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### *Υαλουρονικό οξύ*

Αναφορικά με το υαλουρονικό οξύ η έρευνα δεν κατόρθωσε να καταλήξει σε απτά συμπεράσματα λόγω των πολύ μικρών συγκεντρώσεων στον ορό των δειγμάτων μας (ιχνοποσότητες).

### *Θειϊκή χονδροϊτίνη*

#### **Ομάδα Α**

Οι τιμές της θειϊκής χονδροϊτίνης που προσδιορίστηκαν στους εθελοντές (ομάδα Α) δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τις προεγχειρητικές τιμές των ασθενών (ομάδα Β) (πιν. 3). Η CS είναι το άθροισμα των κλασμάτων CS4 και CS0.

**Πίνακας 3.** Προσδιορισμός τιμών CS (mg/dl) και σύγκριση των ομάδων Α και Β.

	Ομάδα Α	Ομάδα Β (προεγχειρητικά)	p-value
CS4	4.22±1.20 <sup>(1)</sup> 4.31 (2.08 – 8.97) <sup>(2)</sup>	4.36±1.40 <sup>(1)</sup> 4.46 (2.61 – 7.47) <sup>(2)</sup>	NS
CS0	3.10±0.88 4.11 (2.93 – 6.10)	3.90±0.96 3.62 (2.66 – 5.78)	NS
CS (total)	8.32±2.12 8.22 (6.18 – 12.44)	8.27±1.99 8.23 (5.38 – 11.32)	NS

(1) **mean ± std. deviation**

(2) **median (min - max)**

#### **Ομάδα Β**

Όσον αφορά την ομάδα Β δείγματα από ορό αίματος ληφθήκαν πριν και μετά την επέμβαση (on pump procedure) και οι τιμές της CS καθώς και η σύγκριση των τιμών στο χρόνο (pre-post) αναδεικνύονται παρακάτω στον πίνακα 4. Η ολική CS αποτελεί το άθροισμα των κλασμάτων CS4 και CS0. Για την ίδια ομάδα ασθενών έχει γίνει προσδιορισμός του βιοχημικού τους προφίλ μετρώντας τιμές για LDL, HDL, APOA,

APOB, TG και CHOL (πιν. 5). Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν πριν την επέμβαση.

**Πίνακας 4.** Σύγκριση τιμών CS (mg/dl) στους ασθενείς της Β ομάδας πριν (pre) και μετά (post) το χειρουργείο της αορτοστεφανιαίας παράκαμψης με χρήση εξωσωματικής κυκλοφορίας.

	<b>Pre</b>	<b>Post</b>	<b>p-value</b>
<b>CS4</b>	4.36±1.40 <sup>(1)</sup> 4.46 (2.61 – 7.47) <sup>(2)</sup>	5.93±1.30 5.68 (3.56 – 7.90)	<0.01
<b>CS0</b>	3.90±0.96 3.62 (2.66 – 5.78)	6.13±1.26 6.06 (3.57 – 8.63)	<0.01
<b>CS</b>	8.27±1.99 8.23 (5.38 – 11.32)	12.05±2.05 11.78 (7.70 – 15.98)	<0.01

(1) **mean ± std. deviation**

(2) **median (min - max)**

**Πίνακας 5.** Προσδιορισμός επιμέρους βιοχημικών παραγόντων της ομάδας Β προεγχειρητικά.

<b>Descriptives</b>	
<b>LDL</b>	100.59±35.73 <sup>(1)</sup> 100 (38 – 183) <sup>(2)</sup>
<b>HDL</b>	37.82±10.53 38 (22 – 55)
<b>APOA</b>	115.76±21.04 116 (62 – 146)
<b>APOB</b>	33.18±21.58 32 (1 – 67)
<b>TG</b>	119.65±38.82 114 (66 – 185)
<b>CHOL</b>	159.65±40.47 157 (98 – 261)

(1) **mean ± std. deviation**

(2) **median (min - max)**

**Πίνακας 6.** Γραμμική συσχέτιση postCS με preCS με τους προεγχειρητικούς βιοχημικούς δείκτες.

Parameter	B	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval for B	
				Lower Bound	Lower Bound
Constant	10.371	6.044	0.120	-3.301	24.043
Pre CS	0.537	0.336	0.144	-0.223	1.296
LDL	-0.035	0.071	0.638	-0.196	0.127
HDL	-0.094	0.096	0.353	-0.311	0.123
APOA	0.000	0.033	0.993	-0.075	0.075
APOB	0.000	0.040	0.992	-0.089	0.090
TG	-0.013	0.018	0.500	-0.054	0.028
CHOL	0.037	0.072	0.622	-0.125	0.199

**Dependent Variable:** Post CS  
**R=0.680, R<sup>2</sup>=0.462**

### Ομάδα Γ

Στην ομάδα Γ συμπεριλήφθησαν 10 ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης χωρίς τη βοήθεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας. Και σε αυτούς τους ασθενείς κατά αντιστοιχία με τη Β ομάδα οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν προεγχειρητικά και την 3η μετεγχειρητική ημέρα. Επίσης από το προεγχειρητικό δείγμα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του βιοχημικού προφίλ των ασθενών με μέτρηση των ίδιων παραγόντων που εκτιμηθήκαν και για τη Β ομάδα, δηλαδή LDL, HDL, APOA, APOB, TG και CHOL. Στον πίνακα 7 γίνεται σύγκριση των προεγχειρητικών βιοχημικών προφίλ των ομάδων Β και Γ.



**Πίνακας 7.** Σύγκριση βιοχημικών δεικτών και αθηροσκληρωτικών παραγόντων κινδύνου μεταξύ ομάδων Β (on pump) και Γ (off pump).

	B Ομάδα (On-pump operated patients)	Γ Ομάδα (Off-pump operated patients)	
	15 ♀- 25 ♂ mean age ± std. deviation: 66±10.14	4 ♀ - 6 ♂ mean age ± std. deviation: 58±7.20	
<b>LDL</b>	100.59±35.73 <sup>(1)</sup>  100 (38 – 183) <sup>(2)</sup>	110.12±30.22 <sup>(1)</sup> 110(76 – 188) <sup>(2)</sup>	NS
<b>HDL</b>	37.82±10.53  38 (22 – 55)	31.82±11.52 40 (25 – 59)	NS
<b>APOA</b>	115.76±21.04  116 (62 – 146)	120.34±21.04 119 (73– 155)	NS
<b>APOB</b>	33.18±21.58  32 (1 – 67)	32±19.52 31 (21 – 59)	NS
<b>TG</b>	119.65±38.82  114 (66 – 185)	122.15±22.14 120 (49 – 170)	NS
<b>CHOL</b>	159.65±40.47  157 (98 – 261)	170.45±50.55 168 (110 – 297)	NS
<b>DIABETES</b>	18% (7 patients)	20% (2 patients)	NS
<b>ARTERIAL HYPERTENSION</b>	27.5% (11patients)	30% (3 patients)	NS
<b>CURRENT SMOKING ADDICTION</b>	3 patients	1 patient	NS

(1) mean ± std. deviation

(2) median (min - max)

Τέλος, ο πίνακας 8 δείχνει τιμές CS και των κλασμάτων της στο χρόνο (προ-μετα χειρουργείου) καθώς επίσης και συγκρίσεις στις τιμές ανάμεσα στις ομάδες Β (on pump) και Γ (off pump).

**Πίνακας 8.** Τιμές CS (mg/dl) στο χρόνο (pre-post) και σύγκριση Β και Γ ομάδας.

<b>CS4 Pre B</b> 4.36±1.40 <sup>(1)</sup> 4.46 (2.61 – 7.47) <sup>(2)</sup>	<b>CS4 Pre Γ</b> 4.29±1.38 <sup>(1)</sup> 4.22 (2.72 – 6.98) <sup>(2)</sup>	<b>Non significant</b>
<b>CS4 Pre B</b> 4.36±1.40 4.46 (2.61 – 7.47)	<b>CS4 Post B</b> 5.93±1.30 5.68 (3.56 – 7.90)	<b>p-value&lt;0.01</b>
<b>CS4 Pre Γ</b> 4.29±1.38 4.22 (2.72 – 6.98)	<b>CS4 Post Γ</b> 5.12±1.05 4.98 (4.12 – 5.82)	<b>p-value&lt;0.01</b>
<b>CS4 Post B</b> 5.93±1.30 5.68 (3.56 – 7.90)	<b>CS4 Post Γ</b> 5.12±1.05 4.98 (4.12 – 5.82)	<b>p-value&lt;0.05</b>
<b>CS0 Pre B</b> 3.90±0.96 3.62 (2.66 – 5.78)	<b>CS0 Pre Γ</b> 3.84±0.79 3.69 (2.59-5.93)	<b>Non significant</b>
<b>CS0 Pre B</b> 3.90±0.96 3.62 (2.66 – 5.78)	<b>CS0 Post B</b> 6.13±1.26 6.06 (3.57 – 8.63)	<b>p-value&lt;0.01</b>
<b>CS0 Pre Γ</b> 3.84±0.79 3.69 (2.59-5.93)	<b>CS0 Post Γ</b> 5.02±0.93 4.88 (3.55-6.67)	<b>p-value&lt;0.01</b>
<b>CS0 Post B</b> 6.13±1.26 6.06 (3.57 – 8.63)	<b>CS0 Post Γ</b> 5.02±0.93 4.88 (3.55-6.67)	<b>p-value&lt;0.05</b>
<b>CS Pre B</b> 8.27±1.99 8.23 (5.38 – 11.32)	<b>CS Pre Γ</b> 8.13±1.78 8.11 (5.42-11.21)	<b>Non significant</b>
<b>CS Pre B</b> 8.27±1.99 8.23 (5.38 – 11.32)	<b>CS Post B</b> 12.05±2.05 11.78 (7.70 – 15.98)	<b>p-value&lt;0.01</b>
<b>CS Pre Γ</b> 8.13±1.78 8.11 (5.42-11.21)	<b>CS Post Γ</b> 10.12±1.76 9.68 (5.56-12.56)	<b>p-value&lt;0.01</b>
<b>CS Post B</b> 12.05±2.05 11.78 (7.70 – 15.98)	<b>CS Post Γ</b> 10.12±1.76 9.68 (5.56-12.56)	<b>p-value&lt;0.05</b>

**(1) mean ± std. deviation**

**(2) median (min - max)**

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων και των πινάκων μπορούν να συμπεριληφθούν στα εξής:

1. Οι τιμές της CS δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά από τη σύγκριση που προκύπτει μεταξύ των εθελοντών (ομάδα Α) και των προεγχειρητικών τιμών της Β και Γ ομάδας. (πιν. 3 και πιν. 8).
2. Τα βιοχημικό-αθηροσκληρωτικό προφίλ των ασθενών των ομάδων Β και Γ δεν παρουσιάζει διαφορά (πιν. 7).
3. Από τον πίνακα 4 και 8 γίνεται κατανοητό ότι η ολική CS, καθώς και τα κλάσματά της CS4 και CS0, αυξάνονται στατιστικώς σημαντικά μετά το χειρουργείο σε όλους τους ασθενείς που υποβάλλονται σε επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης ( $p < 0,01$ ). Αυτή η αύξηση δε της CS είναι πολύ μεγαλύτερη στην περίπτωση της on pump παραλλαγής (Β ομάδα) από ότι στην off pump (Γ ομάδα) ( $p < 0,05$ ) όπως φαίνεται στον πίνακα 8.
4. Στον πίνακα 6 απεικονίζεται η γραμμική συσχέτιση της postCS με την preCS και με μια σειρά προεγχειρητικών παραμέτρων. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της linear regression analysis οι τιμές των βιοχημικών δεικτών και της preCS δεν αποτελούν προγνωστικούς δείκτες για τη διακύμανση των τιμών της μετεγχειρητικής CS (postCS).

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής καταδεικνύουν ότι η CS αυξάνεται μετεγχειρητικά σε όλους τους ασθενείς που υποβάλλονται σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη. Το στοιχείο κλειδί όμως στη μελέτη αυτή είναι ότι η αύξηση της CS είναι πολύ μεγαλύτερη στους μετεγχειρητικούς ασθενείς στους οποίους εφαρμόστηκε η εξωσωματική κυκλοφορία (on pump), από ότι σε αυτούς που χειρουργήθηκαν με

την off pump τεχνική. Αυτό το σημαντικό στοιχείο μας ωθεί να δηλώσουμε ότι η αύξηση της CS δεν σχετίζεται αποκλειστικά και μόνο με τους διεγχειρητικούς χειρισμούς, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την προκαλούμενη μυοκαρδιακή βλάβη, αλλά είναι και άρρηκτα συνδεδεμένη με την φλεγμονώδη αντίδραση που γεννά η εφαρμογή της εξωσωματικής κυκλοφορίας. Παρά το γεγονός ότι και στις δυο τεχνικές που εφαρμόζονται παγκοσμίως (on pump-off pump), υπάρχει σε ένα βαθμό το προκαλούμενο “χειρουργικό τραύμα”, είναι πιθανόν ότι η χρήση της εξωσωματικής κυκλοφορίας είναι αυτή που κυρίως προκαλεί τη φλεγμονώδη αντίδραση και κατά συνέπεια την αύξηση της CS. Η έντονη αυτή αντίδραση σχετίζεται με την διακίνηση του αίματος σε τεχνητές μη-επιθηλιακές μεμβράνες, με την εφαρμοζόμενη υποθερμία, τη συνεχή ροή της εξωσωματικής μηχανής, καθώς και με την χορηγούμενη ψυχρή καρδιοπληγία [106,107, 108]. Έχει επαρκώς καταγραφεί ότι το σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS) μπορεί να ανιχνευτεί σε κάποιο βαθμό σε όλους τους ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωσωματική κυκλοφορία και τα τελευταία δεδομένα στην ιατρική βιβλιογραφία υποστηρίζουν σθεναρά ότι το σύνδρομο αυτό μετριάζεται στις off pump επεμβάσεις [109, 110, 111]. Στο παρελθόν, αρκετοί παράγοντες-δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να εκτιμήσουν τη βαρύτητα του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης. Κάποιοι από αυτούς είναι ο παράγοντας νεκρώσεως των όγκων (TNF), η ιντερλευκίνη-1, η ιντερλευκίνη-6 και άλλοι [112], ενώ αξίζει να αναφέρουμε κάποιες νεότερες μελέτες που κάνουν λόγο για τις σημαντικές δράσεις των στατινών στη μείωση των δεικτών φλεγμονής που μετρώνται μετά από εξωσωματική κυκλοφορία [113]. Η χρησιμότητα και η πρωτοπορία της μελέτης αυτής έχει να κάνει με τη χρησιμοποίηση για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία μιας γλυκοζαμινογλυκάνης (CS) στην περιεγχειρητική διαγνωστική της χειρουργικής επαναιμάτωσης των στεφανιαίων.

Αυτή η πρωτοποριακή και πολλά υποσχόμενη μέθοδος έχει εφαρμοστεί σε μικρό σχετικά δείγμα ασθενών. Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων καθώς και των πλεονεκτημάτων που η μέθοδος φέρει, θα πρέπει να γίνει με μεγαλύτερους αριθμούς ασθενών (μεγαλύτερη τυχαιοποιημένη μελέτη) και σε ευρύτερο φάσμα χειρουργικών επεμβάσεων. Αυτό ίσως καθιερώσει στο μέλλον την CS ως δείκτη συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### **ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΟΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΩΝ ΘΕΙΚΗΣ ΧΟΝΔΡΟΪΤΙΝΗ-ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ**

*Ποσοτικός προσδιορισμός της θειικής χονδροϊτίνης στον ορό ασθενών που υποβάλλονται σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη*

**Σκοπός:** Τα αλματώδη βήματα που καταγράφονται τα τελευταία χρόνια σε ολόκληρο το φάσμα των ανθρωποκεντρικών επιστημών έχουν βοηθήσει το σύγχρονο επιστήμονα αφενός να κατανοεί ολοένα και καλύτερα τους μηχανισμούς οι οποίοι συμβάλλουν στην ανάπτυξη της οντότητας αυτής και αφετέρου να την αντιμετωπίσει αποτελεσματικότερα. Έτσι, έρχονται συνεχώς στο φως νεότερα δεδομένα που σχετίζονται με τις γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) και τους τρόπους δράσεως των μορίων αυτών. Ο σκοπός της διατριβής αυτής ήταν ο προσδιορισμός της θειικής χονδροϊτίνης στον ορό του αίματος ασθενών που υποβάλλονται σε επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης καθώς και η αποσαφήνιση του μοντέλου μεταβολής της γλυκοζαμινογλυκάνης αυτής σε συνάρτηση με το χρόνο εκτέλεσης του χειρουργείου.

**Υλικό και μέθοδοι:** Αρχικά μελετήθηκαν τα δείγματα 18 υγιών εθελοντών (8 γυναίκες και 10 άνδρες) οι οποίοι ήταν ηλικίας 19-67 ετών, χωρίς ιστορικό στηθάγχης και χωρίς κανένα αθηροσκληρωτικό παράγοντα κινδύνου στο ιστορικό τους (υπέρταση, παχυσαρκία, υπερλιπιδαιμία, κάπνισμα, θετικό οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου), (κριτήρια αποκλεισμού). Η παραπάνω ομάδα (ομάδα Α) δεν ελάμβανε κανένα φαρμακευτικό σκεύασμα.

Στην επομένη φάση επιλέχθηκαν 40 ασθενείς της Χειρουργικής Κλινικής Καρδιάς-Αγγείων-Θώρακα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας οι οποίοι έπασχαν από στεφανιογραφικά επιβεβαιωμένη στεφανιαία νόσο και επρόκειτο να υποβληθούν σε εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (ομάδα Β). Οι ασθενείς ελάμβαναν στατίνες, αντιυπερτασικά (b blockers) και ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους μέχρι και 2 ημέρες πριν το χειρουργείο. Από τους ασθενείς αυτούς οι 25 ήταν άνδρες και 15 γυναίκες. Πιο συγκεκριμένα στην παραπάνω ομάδα (ομάδα Β), το ηλικιακό εύρος των ασθενών ήταν 44-86 έτη και η μέση ηλικία τα 66 έτη. Οι ασθενείς της Β ομάδας προεγχειρητικά και μετεγχειρητικά (3<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα) υποβλήθηκαν σε αιμοληψία και με τις τιμές των προεγχειρητικών μετρήσεων πραγματοποιήθηκε αρχικά ένας προσδιορισμός του βιοχημικού-αθηροσκληρωτικού τους προφίλ μετρώντας παράγοντες όπως ολική χοληστερίνη, τριγλυκερίδια, ApoA, ApoB λιποπρωτείνες, HDL και LDL. Το χειρουργείο πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας (on pump). Τέλος, η θειϊκή χονδροϊτίνη προσδιορίστηκε και σε μια μικρή ομάδα ασθενών που υπεβλήθησαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη χωρίς τη βοήθεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας (off pump), (ομάδα Γ με 10 ασθενείς, 6 άνδρες και 4 γυναίκες, με ηλικιακό εύρος ασθενών τα 39-69 έτη και μέση ηλικία τα 58 έτη).

**Αποτελέσματα:** Η ολική CS καθώς και τα κλάσματά της CS4 και CS0, αυξάνονται στατιστικώς σημαντικά μετά το χειρουργείο σε όλους τους ασθενείς που υποβάλλονται σε επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης ( $p < 0,01$ ). Αυτή η αύξηση δε της CS είναι πολύ μεγαλύτερη στην περίπτωση της on pump παραλλαγής (Β ομάδα) από ότι στην off pump (Γ ομάδα) ( $p < 0,05$ ).

**Συμπεράσματα:** Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής καταδεικνύουν ότι η CS αυξάνεται μετεγχειρητικά σε όλους τους ασθενείς που υποβάλλονται σε

αορτοστεφανιαία παράκαμψη. Το στοιχείο κλειδί όμως στη μελέτη αυτή είναι ότι η αύξηση της CS είναι πολύ μεγαλύτερη στους μετεγχειρητικούς ασθενείς στους οποίους εφαρμόστηκε η εξωσωματική κυκλοφορία (on pump), από ότι σε αυτούς που χειρουργήθηκαν με την off pump τεχνική. Αυτό το σημαντικό στοιχείο μας ωθεί να δηλώσουμε ότι η αύξηση της CS δεν σχετίζεται αποκλειστικά και μόνο με τους διεγχειρητικούς χειρισμούς οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την προκαλούμενη μυοκαρδιακή βλάβη αλλά είναι και άρρηκτα συνδεδεμένη με την φλεγμονώδη αντίδραση που γεννά η εφαρμογή της εξωσωματικής κυκλοφορίας. Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων καθώς και των πλεονεκτημάτων που η μέθοδος φέρει, θα πρέπει να γίνει με μεγαλύτερους αριθμούς ασθενών (μεγαλύτερη τυχαιοποιημένη μελέτη) και σε ευρύτερο φάσμα χειρουργικών επεμβάσεων.



## **SUMMARY**

### **Glycosaminoglycans and atherosclerosis: monitoring serum chondroitin sulfate in patients submitted to coronary artery bypass grafting surgery**

**PhD Thesis by Dimos Karangelis**

**Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, University of Thessaly, Larissa, Greece**

**Aim:** Cardiovascular disease is the largest cause of death in Western societies and it primarily results from the atherosclerosis to large- to medium-sized vessels, which leads to myocardial infarction when it occurs in the coronary arteries or stroke when it occurs in the cerebral arteries. Pathological processes involved in microvascular disease include the accumulation of lipid retained by extracellular matrix (ECM) molecules, especially by the chondroitin sulfate/dermatan sulfate (CS/DS) proteoglycans (PGs) versican, biglycan and decorin. The CS/DS proteoglycans have a higher affinity for LDL binding and it is hypothesized that chemically and structurally altered PGs have even higher affinity for LDL, and thus, exacerbate lipid retention.

Our study was designed to identify the amounts of glycosaminoglycans (GAGs) of two subgroups (chondroitin-4-sulfate and chondroitin-0-sulfate) and the overall amount of total chondroitin sulfate (CS), in serum of patients following coronary artery bypass graft surgery (CABG).

**Patients and Methods:** A total of 68 individuals were recruited for this prospective randomized-study eligible patient's research. The first category consisted of healthy individuals (18 subjects). The second group included patients who underwent on pump CABG (40 patients) while the third group included patients to whom off pump

cardiac surgery was performed (10 patients). The concentrations of CS were measured before and after the operation on the 3rd postoperative day and an atherosclerotic profile was identified by determining biochemical markers preoperatively. The values of CS were investigated by capillary electrophoresis.

**Results:** The amount of GAGs (CS4, CS0 and CS) was significantly higher in all patients after the operation (p value <0.01). The values of healthy individuals were similar to preoperative patient values. CS values were significantly enhanced postoperatively in all patients who underwent CABG. This increase was to a significant extent much higher in the on pump group of patients.

**Conclusions:** The results of this PhD thesis have explicitly shown that CS was increased in all series of patients who were submitted to CABG. The key element though is that a statistically significant enhance in CS was observed in the patients to whom the on pump procedure was performed comparing with the off pump operation. This data induce us to state that CS is augmented not only by the intraoperative manipulations which are accountable for myocardial injury but is also indissolubly connected to the inflammatory response as a result of cardiopulmonary bypass (CPB) application. Although in both conventional CABG and off pump CABG there is a comparable surgical trauma, it is our belief that CPB is one of the most important factors responsible for stimulating an inflammatory response. This intense inflammatory reaction is caused mainly due to, blood contact with the artificial bypass surface, conversion to laminar flow, cold cardiac ischemia, continuous pulse wave and hypothermia. It is well documented that the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) can be detected to some degree in nearly all patients subjected to a pump oxygenator and the up to date medical literature strongly supports that SIRS after off pump procedures is mitigated compared with the on pump

operation. Several parameters and markers (e.g. IL1, IL6, tumor necrosis factor TNF,) have been previously recruited for evaluating the severity of SIRS following CABG. What this study has to offer, is the application and involvement for the first-time in medical literature of the CS serum values' measurement in the perioperative diagnostics of coronary revascularization surgery. These values seem to provide advantages in the detection of perioperative myocardial damage due to surgical manipulations, but from the results of our research also seem to be connected to the inflammatory response after CBP, as the comparison between on pump and off pump-operated patients has shown. This novel and most-promising method, is for the time being based on a relative small sample of patients; the confirmation of its results by a larger randomized study (which will include all sorts of cardiac operations) will probably establish it in the future as a first line approach for the detection of systemic inflammatory response after heart surgery.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

**GAGs** : Γλυκοζαμινογλυκανες

**PGs** : πρωτεογλυκάνες

**VEGF** : ενδοθηλιακός αυξητικός αγγειακός παράγοντας

**CS** : Θεϊκή Χονδροϊτίνη

**HA** : Υαλουρονικό οξύ

**DS** : θεική δερματάνη

**HS** : θεική ηπαράνη

**KS** : θεική κερατάνη

**HMG-COA** αναγωγή: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA αναγωγή

**HDL** : High Density Lipoprotein

**LDL** : Low Density Lipoprotein

**VLDL** : Very Low Density Lipoprotein

**TG** : Triglyceride

**CHOL** : Cholesterol

**MIDCAB** : minimal invasive direct coronary artery bypass

**GalNAc** : *N*-ακετυλογαλακτοζαμίνη

**GlcNAc** : *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη

**GlcA** : γλυκουρονικό

**IdoA** : ιδουρονικό οξύ

**ECM** : εξωκυττάριο χώρο

**Apo A**: απολιποπρωτεΐνη A

**Apo B** : απολιποπρωτεΐνη B

**Ig domain**: immunoglobulin

**PTR:** proteoglycan tandem repeats

**EGF:** epidermal growth factor

**CRD:** carbohydrate recognition domain

**CBP:** complement binding protein-like motif

**ADAMTS :** A Disintegrin And Metaloprotease with Thrombospondin repeats

**HPCE ή CE :** τριχοειδής ηλεκτροφόρηση υψηλής επίδοσης

**EOF:** ηλεκτροσμωτική ροή

**EM :** ηλεκτροφορητική κινητικότητα

**CZE :** Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης

**CITP :** Τριχοειδής ισοταχοφόρηση

**CGE :** Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση γέλης

**CIEF :** Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης εστίασης

**CEC :** Τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία

**MEEKC :** Ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία μικρογαλακτώματος

**FSCE :** τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ελεύθερου διαλύματος

**SCE :** τριχοειδής ηλεκτροφόρηση με μοριακά κόσκινα

**preCS :** προεγχειρητική CS

**postCS :** μετεγχειρητική CS

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cheng TO. James Herrick, sickle cell disease, and the thrombogenic theory of myocardial infarction. *J Lab Clin. Med.* 2002 Aug; 140(2):126.
2. Μενέλαος Παπαδημητρίου “Εσωτερική Παθολογία” Πρώτος Τόμος σελ. 288-289.
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000 Sep 14; 407(6801):233-41.
4. Duff GL, McMillan GC. Pathology of atherosclerosis. *Am J Med.* 1951 Jul; 11(1):92-108.
5. Ευστρατιάδης Γεώργιος “Λιπίδια, Αθηροσκλήρωση, Δυσλιπιδαιμίες” Θεσσαλονίκη 1998 σελ. 75-90
6. Theocharis AD, Tsolakis I, Hjerpe A, Karamanos NK. Human abdominal aortic aneurysm is characterized by decreased versican concentration and specific downregulation of versican isoform V (0). *Atherosclerosis.* 2001 Feb 1; 154(2):367-76.PMID: 11166769.
7. Theocharis AD, Tsolakis I, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Chondroitin sulfate as a key molecule in the development of atherosclerosis and cancer progression. *Adv Pharmacol.* 2006;53:281-95
8. Theocharis AD, Theocharis DA, De Luca G, Hjerpe A, Karamanos NK. Compositional and structural alterations of chondroitin and dermatan sulfates during the progression of atherosclerosis and aneurysmal dilatation of the human abdominal aorta. *Biochimie.* 2002 Jul; 84(7):667-74
9. N. Tsilimingas, A. Warnholtz, M Wendt, T Muenzel. Angiotensin II and oxidative stress. *J. of experimental pharmacology* 2004 Sept. 163/II. 3-20.
10. Μενέλαος Παπαδημητρίου “Εσωτερική Παθολογία” τομ. 1 σελ 288-300

11. August M, Wingerter O, Oelze M, Wenzel P, Kleschyov AL, Daiber A, Mülsch A, Münzel T, Tsilimingas N. Mechanisms underlying dysfunction of carotid arteries in genetically hyperlipidemic rabbits. *Nitric Oxide*. 2006 Nov; 15(3):241-51. Epub 2006 Apr 4.
12. Hink U, Tsilimingas N, Wendt M, Münzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus: therapeutic implications. *Treat Endocrinol*. 2003; 2(5):293-304. Review.
13. Warnholtz A, Tsilimingas N, Wendt M, Münzel T. Mechanisms underlying nitrate-induced endothelial dysfunction: insight from experimental and clinical studies. *Heart Fail Rev*. 2002 Oct; 7(4):335-45. Review.
14. Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, Woelken-Weckmüller S, Walter U, Reichenspurner H, Meinertz T, Münzel T. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation*. 2002 Mar 12;105(10):1170-5.
15. Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD (P) H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*. 2002 Mar 8; 90(4):E58-65.
16. Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, Daiber A, Mollnau H, August M, Baldus S, Tsilimingas N, Walter U, Ullrich V, Münzel T. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Nov 19;42(10):1826-34.

17. Robert Beaglehole, et al. 2004 The World Health Report 2004 - Changing History. World Health Organization. pp. 120–4
18. Farmer JA, Gotto AM. Dyslipidemia and other risk factors for coronary artery disease. In: Braunwald E, ed. Heart disease: a Textbook of Cardiovascular Medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1997: 1126-60
19. Γ. Λουρίδας. “Καρδιολογία” University studio press Θεσσαλονίκη 2001 σελ. 323-325
20. Γ. Λουρίδας. “Καρδιολογία” University studio press Θεσσαλονίκη 2001 σελ. 333-345
21. Γ. Λουρίδας. “Καρδιολογία” University studio press Θεσσαλονίκη 2001 σελ. 343-362
22. Cohen MG, Fonarow GC, Peterson ED, Moscucci M, Dai D, Hernandez AF, Bonow RO, Smith SC Jr. Racial and ethnic differences in the treatment of acute myocardial infarction: findings from the get with the guidelines-coronary artery disease program. Circulation. 2010 Jun 1;121(21):2294-301. Epub 2010 May 17.
23. Brotons Cuixart C, Moral Peláez I. Primary prevention of cardiovascular disease with aspirin: what do the guidelines say? Aten Primaria. 2010 May 14
24. Γ. Λουρίδας. “Καρδιολογία” University studio press Θεσσαλονίκη 2001 σελ. 362-368
25. D Yuh, L Vricella, W Baumgartner. “The Johns Hopkins Manual of Cardiothoracic Surgery” McGraw-Hill 2007 p. 369-384 "cardiopulmonary bypass"
26. L. Cohn. “Cardiac Surgery in the Adult”. McGraw-Hill, Third Edition
27. J. Froemke. “Standardoperation in Herzchirurgie”. Darmstadt, 2002



28. P. Soltoski, H. Karamanoukian, T. Salerno. "Cardiac Surgery Secrets", Second Edition, 2000
29. Π. Σπανός, Γ Μπουγιούκας, Π Ασημακόπουλος, Κ Αναγνωστόπουλος, Φ Παναγόπουλος, Π Σπύρου. «Στοιχεία Καρδιοχειρουργικής». University Studio Press, 1999
30. Kirklin/Barratt-Boyes Cardiac Surgery, 3<sup>rd</sup> Edition, Elsevier 2003 By NT Kouchoukos, EH Blackstone, DB Doty, FL Hanley, RB Karp
31. Lamari FN, Karamanos NK. Structure of chondroitin sulfate. Review *Adv Pharmacol.* 2006;53:33-48
32. T.N.Wight, M.G. Kinsella, E.E. Owarnstrom, The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 4 (1992) 793–801.
33. T.N.Wight, Cell biology of arterial proteoglycans, *Arteriosclerosis* 9 (1989) 1–20.
34. Neha S. Gandhi and Ricardo L. Mancera. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem Biol Drug Des* 2008; 72: 455–482
35. T.N. Wight, Arterial wall, in: W.D. Comper (Ed.), *Extracellular Matrix, Tissue Function*, OPA, Amsterdam, 1996, pp. 175–202.
36. Malavaki C, Mizumoto S, Karamanos N, Sugahara K. Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease. *Connect Tissue Res.* 2008;49(3):133-9.
37. Nordestgaard BG, Wootton R, Lewis B. Selective retention of VLDL, IDL and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits *in vivo*. Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima-inner media. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:534–42
38. Camejo G, The interaction of lipids and lipoproteins with the intercellular matrix of arterial tissue: Its possible role in atherogenesis, *Adv Lip Res* 19, 1–54 (1982).

39. Bor'en J, et al., Identification of the principal proteoglycan binding site in LDL: A single point mutation in apolipoprotein B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding, *J Clin Invest* 101, 2658–64 (1998).
40. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD, Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes, *Physiol Rev* 71, 481–539 (1991).
41. Urban Olsson, Gunnel Ostergren-Lund'en and Jonatan Moses. Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction. *Glycoconjugate Journal* 18, 789–797, 2001
42. Kovanen PT, Pentikainen MO, Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: A novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque, *Trends Cardiovasc Med* 9, 86–91 (1999).
43. Srinivasan, S. R., Xu, J. H., Vijayagopal, P., Radhakrishnamurthy, B., and Berenson, G. S. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1272, 61–67
44. Vijayagopal, P., Figueroa, J. E., Fontenot, J. D., and Glancy, D. L. (1996) *Atherosclerosis* 127, 195–203
45. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 1998;139:205–22
46. A.M.F. Tovar, D.C.F. Cesar, G.C. Leta, P.A.S. Mourao, Age-related changes in populations of aortic glycosaminoglycans, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 604–614.
47. T. Sambandam, J.R. Baker, J.E. Christner, S.L. Ekborg, Specificity of the low density lipoproteins–glycosaminoglycan interaction, *Arterioscler. Thromb.* 11 (1991) 561–568.

48. Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Wiklund O, Bondjers G. Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *J Lipid Res* 1990;31:1387–98
49. Camejo G, Rosengren B, Olsson U, et al. Molecular basis of the association of arterial proteoglycans with low density lipoproteins: its effects on the structure of the lipoprotein particle. *Eur Heart J* 1990;11(Suppl. E):164–73
50. Olsson U, Camejo G, Olofsson SO, Bondjers G. Molecular parameters that control the association of low density lipoprotein apo B-100 with chondroitin sulphate. *Biochim Biophys Acta* 1991;1097:37–44
51. Olsson U, Camejo G, Bondjers G. Binding of synthetic apolipoprotein B-100 peptide and peptide analogues to chondroitin 6-sulfate: effects of the lipid environment. *Biochemistry* 1993;32:1858–65
52. Barbara J. Meyer, Laurence Duvillard, Alice Owen, Christopher J. Packard, Muriel J. Caslake. Fractionation of cholesteryl ester rich intermediate density lipoprotein subpopulations by chondroitin sulphate. *Atherosclerosis* 195 (2007) e28–e34
53. Anber V, Millar JS, McConnell M, Shepherd J, Packard CJ. Interaction of VLDL, IDL, and LDL with human arterial wall proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2507–14
54. Achilleas D. Theocharis , Dimitrios A. Theocharis , Giancarlo De Luca , Anders Hjerpe , Nikos K. Karamanos. Compositional and structural alterations of chondroitin and dermatan sulfates during the progression of atherosclerosis and aneurysmal dilatation of the human abdominal aorta. *Biochimie* 84 (2002) 667–674
55. Little, P. J., Tannock, L., Olin, K. L., Chait, A., and Wight, T. N. (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 55–60

56. Zimmermann DR. Versican. In: Iozzo RV, ed. *Proteoglycans: Structure, Biology and Molecular Interactions*. New York, NY: Marcel Dekker Inc. 2000:327–341.
57. Wagner WD, Salisbury BGJ, Rowe A. A proposed structure of chondroitin 6-sulfate proteoglycan of human normal and adjacent atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6:407–417.
58. Bode-Lesniewska B, Dours-Zimmerman MT, Odermatt BF, Briner J, Heitz PV, Zimmerman DR. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult tissues. *J Histochem Cytochem*. 1996;44: 303–312.
59. Edwards IJ, Wagner WD. Distinct synthetic and structural characteristics of proteoglycans produced by cultured artery smooth muscle cells of atherosclerosis-susceptible pigeons. *J Biol Chem*. 1988; 263:9612–9620.
60. Shirk RA, Parthasarathy N, San Antonio JD, Church FC, Wagner W. Altered dermatan sulfate structures and reduced heparin cofactor II– stimulating activity of biglycan and decorin from human atherosclerotic plaque. *J Biol Chem*. 2000; 275:18085–18092.
61. Wight TN, Lara S, Riesen R, LeBaron R, Isner J. Selective deposit of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries. *Am J Pathol*. 1997; 151:963–973.
62. Morita, H., Takeuchi, T., Suzuki, S., Maeda, K., Yamada, K., Eguchi, G., and Kimata, K. (1990) *Biochem. J*. 265, 61–68
63. Yao, L. Y., Moody, C., Schonherr, E., Wight, T. N., and Sandell, L. J. (1994) *Matrix Biol*. 14, 213–225
64. Shinomura, T., Nishida, Y., Ito, K., and Kimata, K. (1993) *J. Biol. Chem*. 268, 14461–14469

65. Wight TN. The vascular extracellular matrix. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. New York, NY: Raven Press; 1996:421– 440.
66. Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M, Kimata K. Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts: implications for their roles in cell-substratum adhesion. *J Cell Sci*. 1993; 106:55– 65.
67. Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem*. 1989; 264:8012– 8018.
68. Shinomura T, Zako M, Ito K, Ujita M, Kimata K. The gene structure and organization of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan: genomic background for the generation of multiple PG-M transcripts. *J Biol Chem*. 1995;270:10328 –10333.
69. Naso MF, Zimmermann DR, Iozzo RV. Characterization of the complete genomic structure of the human versican gene and functional analysis of its promoter. *J Biol Chem*. 1994; 269:32999 –33008.
70. Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M, Kimata K. Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem*. 1995; 270:958 –965.
71. Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR. A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem*. 1994; 269:32992–32998.

72. Yao LY, Moody C, Schonherr E, Wight TN, Sandell LJ. Identification of the proteoglycan versican in aorta and smooth muscle cells by DNA sequence analysis, in situ hybridization and immunohistochemistry. *Matrix Biol.* 1994;14:213–225.
73. Schonherr E, Jarvelainen HT, Sandell LJ, Wight TN. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1991; 266:17640–17647.
74. Joan M. Lemire, Kathleen R. Braun, Patrice Maurel, Elizabeth D. Kaplan, Stephen M. Schwartz, Thomas N. Wight. Versican/PG-M Isoforms in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19:1630-1639
75. Matsuura, R., Isaka, N., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., Sakakura, T., and Nakano, T. (1996) *J. Pathol.* 180, 311–316
76. Wight, T. N., Lara, S., Riessen, R., Le Baron, R., and Isner, J. (1997) *Am. J. Pathol.* 151, 963–973
77. Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., Weber, D. K., Kutys, R., Wight, T. N., and Virmani, R. (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1642–1648
78. McGee, M., and Wagner, W. D. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1921–1927
79. Sandy, J. D., Westling, J., Kenagy, R. D., Iruela-Arispe, M. L., Verscharen, C., Rodriguez-Mazaneque, J. C., Zimmermann, D. R., Lemire, J. M., Fischer, J. W., Wight, T. N., and Clowes, A. W. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 13372–13378
80. Somerville, R. P., Longpre, J. M., Jungers, K. A., Engle, J. M., Ross, M., Evanko, S. Wight, T. N., Leduc, R., and Apte, S. S. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 9503–9513
81. Zheng, P. S., Vais, D., Lapierre, D., Liang, Y. Y., Lee, V., Yang, B. L., and Yang, B. B. (2004) *J. Cell Sci.* 117, 5887–5895

82. Peng-Sheng Zheng, Marciano Reis, Cathy Sparling, Daniel Y. Lee, David P. La Pierre, Chung-Kwun Amy Wong, Zhaoqun Deng, Shireen Kahai, Jianping Wen, and Burton B. Yang. Versican G3 Domain Promotes Blood Coagulation through Suppressing the Activity of Tissue Factor Pathway Inhibitor-1. *The journal of biological chemistry* vol. 281, No. 12, pp. 8175–8182, March 24, 2006
83. McGee, M., and Wagner, W. D. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1921–1927
84. Zheng, P. S., Wen, J., Ang, L. C., Sheng, W., Vilorio-Petit, A., Wang, Y., Wu, Y., Kerbel, R. S., and Yang, B. B. (2004) *FASEB J.* 18, 754–756
85. Wijelath, E. S., Murray, J., Rahman, S., Patel, Y., Ishida, A., Strand, K., Aziz, S., Cardona, C., Hammond, W. P., Savidge, G. F., Rafii, S., and Sobel, M. (2002) *Circ. Res.* 91, 25–31
86. Maria McGee, William D. Wagner. Chondroitin Sulfate Anticoagulant Activity Is Linked to Water Transfer Relevance to Proteoglycan Structure in Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23;1921-1927
87. Volpi N. "Fast moving" and "slow moving" heparins, dermatan sulfate, and chondroitin sulfate: qualitative and quantitative analysis by agarose-gel electrophoresis. *Carbohydr Res.* 1993 Sep 2;247:263-78
88. Volpi N. Anal Biochem. 1994 May 1;218(2):382-91 Fractionation of heparin, dermatan sulfate, and chondroitin sulfate by sequential precipitation: a method to purify a single glycosaminoglycan species from a mixture
89. Volpi N, Maccari F. Detection of submicrogram quantities of glycosaminoglycans on agarose gels by sequential staining with toluidine blue and Stains-All. *Electrophoresis.* 2002 Dec; 23(24):4060-6.

90. Huang Y, Toyoda H, Koshiishi I, Toida T, Imanari T. Determination of a depolymerized holothurian glycosaminoglycan in plasma after intravenous administration by postcolumn HPLC. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1995 Dec; 43(12):2182-6.
91. Karamanos NK, Hjerpe A. Intact and oligomeric glycosaminoglycans analyzed with capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2001; 171:193-8
92. Lamari FN, Militsopoulou M, Mitropoulou TN, Hjerpe A, Karamanos NK. Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides in biologic samples by capillary electrophoresis and protocol for sequencing glycosaminoglycans. *Biomed Chromatogr*. 2002 Apr; 16(2):95-102. Review.
93. Volpi N Separation of capsular polysaccharide K4 and defructosylated K4 derived disaccharides by high-performance capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*. 2003 Mar;24(6):1063-8
94. Upreti VV, Khurana M, Cox DS, Eddington ND. Determination of endogenous glycosaminoglycans derived disaccharides in human plasma by HPLC: validation and application in a clinical study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006 Feb 2; 831(1-2):156-62. Epub 2005 Dec 27.
95. Volpi N. Hyaluronic acid and chondroitin sulfate unsaturated disaccharides analysis by high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection with dansylhydrazine. *Anal Biochem*. 2000 Jan 1;277(1):19-24
96. Du J, Eddington N. Determination of the chondroitin sulfate disaccharides in dog and horse plasma by HPLC using chondroitinase digestion, precolumn derivatization, and fluorescence detection. *Anal Biochem*. 2002 Jul 15;306(2):252-8



97. Akiyama H, Toyoda H, Yamanashi S, Sagehashi Y, Toida T, Imanari T. Microdetermination of hyaluronic acid in human urine by high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 1991 Sep;5(5):189-92
98. Sakai S, Onose J, Nakamura H, Toyoda H, Toida T, Imanari T, Linhardt RJ. Pretreatment procedure for the microdetermination of chondroitin sulfate in plasma and urine. *Anal Biochem.* 2002 Mar 15; 302(2):169-74
99. Grimshaw J, Trocha-Grimshaw J, Fisher W, Rice A, Smith S, Spedding P, Duffy J, Mollan R. Quantitative analysis of hyaluronan in human synovial fluid using capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 1996 Feb;17(2):396-400
100. Mitropoulou TN, Lamari F, Syrokou A, Hjerpe A, Karamanos NK. Identification of oligomeric domains within dermatan sulfate chains using differential enzymic treatments, derivatization with 2-aminoacridone and capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2001 Aug; 22(12):2458-63
101. Yang Y, Breadmore MC, Thormann W. Analysis of the disaccharides derived from hyaluronic acid and chondroitin sulfate by capillary electrophoresis with sample stacking. *J Sep Sci.* 2005 Nov; 28(17):2381-9.
102. Karamanos NK, Axelsson S, Vanky P, Tzanakakis GN, Hjerpe A. Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans. *J Chromatogr A.* 1995 Apr 14; 696(2):295-305.
103. Karamanos NK, Vanky P, Tzanakakis GN, Hjerpe A. High performance capillary electrophoresis method to characterize heparin and heparan sulfate disaccharides. *Electrophoresis.* 1996 Feb; 17(2):391-5.

104. Militopoulou M, Lamari FN, Hjerpe A, Karamanos NK. Determination of twelve heparin- and heparan sulfate-derived disaccharides as 2-aminoacridone derivatives by capillary zone electrophoresis using ultraviolet and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 2002 Apr; 23(7-8):1104-9
105. Karamanos NK, Hjerpe A. A survey of methodological challenges for glycosaminoglycan/proteoglycan analysis and structural characterization by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998 Nov; 19(15):2561-71
106. Larman J, Theilmeier G. (2004) Inflammatory response to cardiac surgery: cardiopulmonary bypass versus non-cardiopulmonary bypass surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. Sep; 18(3):425-38
107. Albert A, Ennker J, Sergeant P. (2006). Should we avoid cardiopulmonary bypass with diabetic patients? *Clin Res Cardiol*. Jan; 95 Suppl 1:i40-7
108. Day JR, Taylor KM The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass.. *Int J Surg*. 2005; 3(2):129-40. Epub 2005 Aug 1.
109. Edward H. Kinkaid, John W. Hammon. Cardiopulmonary Bypass In : David D Yuh, Luca A. Vricella, William A. Baumgartner (2007) Johns Hopkins manual of cardiothoracic surgery pp. 369-379
110. Sobieski MA 2nd, Graham JD, Pappas PS, Tatooles AJ, Slaughter MS. Reducing the effects of the systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: can single dose steroids blunt systemic inflammatory response syndrome? *ASAIO J*. 2008 Mar-Apr;54(2):203-6
111. Matsuura K, Imamaki M, Ishida A, Shimura H, Fujita H, Niitsuma Y, Miyazaki M. Low systemic vascular resistance state following off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2008 Feb; 14(1):15-21.

112. Mei YQ, Ji Q, Liu H, Wang X, Feng J, Long C, Cheng B, Xing Y, Li J, Hu D. (2007) Study on the relationship of APACHE III and levels of cytokines in patients with systemic inflammatory response syndrome after coronary artery bypass grafting. *Biol Pharm Bull.* Mar; 30(3):410-4
113. Tamayo E, Alvarez FJ, Alonso O, Bustamante R, Castrodeza J, Soria S, Lajo C. Effects of simvastatin on systemic inflammatory responses after cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2009 Oct;50(5):687-94