

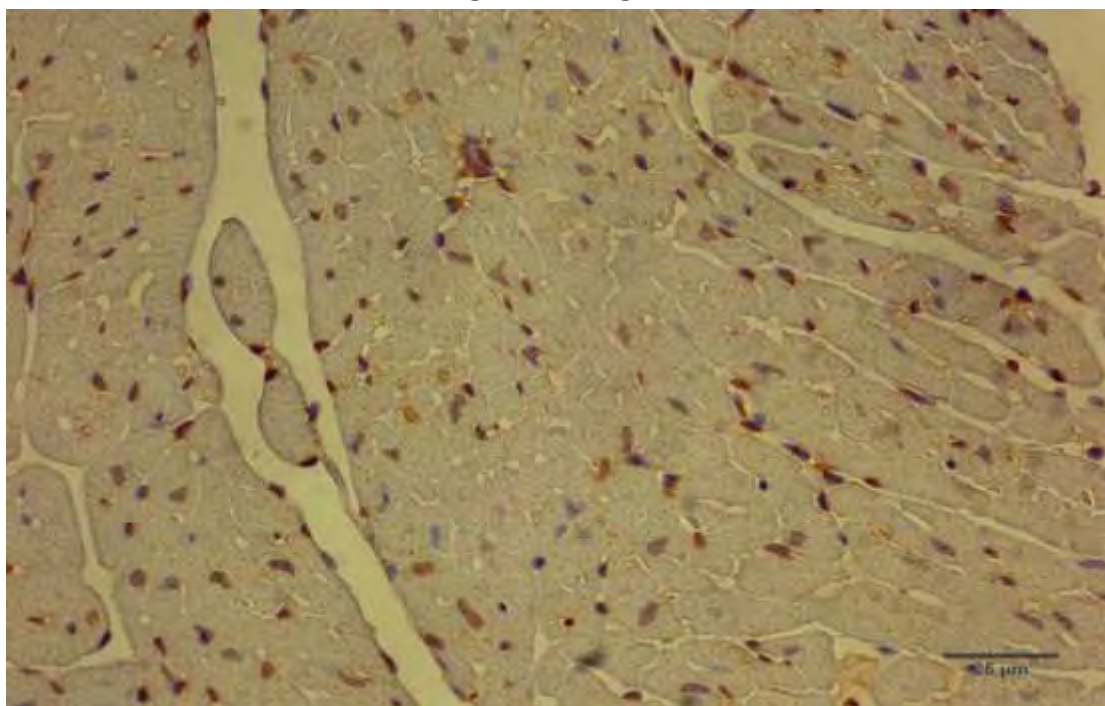


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ, HIF – 1α, ΣΕ
ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΤΙΚΕΣ ΠΛΑΚΕΣ ΑρΟΕ ΚΝΟΣΚΟΥΤ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΥΠΟ
ΑΓΩΓΗ ΜΕ
ΥΔΡΟΞΥΧΛΩΡΟΚΙΝΗ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΟΥΛΑΚΙΔΑ ΕΙΡΗΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

**ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ, HIF – 1α, ΣΕ
ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΤΙΚΕΣ ΠΛΑΚΕΣ ApoE KNOCK OUT ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΥΠΟ ΑΓΩΓΗ ΜΕ
ΥΔΡΟΞΥΧΛΩΡΟΚΙΝΗ**

Υπεύθυνη καθηγήτρια:

- ❖ **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- ❖ **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα καθηγήτρια**
- ❖ **Μακαρίτσης Κωνσταντίνος**, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**
- ❖ **Κουρέτας Δημήτριος**, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το διευθυντή του τμήματος και Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής, κ. Κουκούλη Γεώργιο, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο της Παθολογικής Ανατομικής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Μακαρίτση Κωνσταντίνο, για την πολύτιμη βοήθειά του, τη διαρκή υποστήριξή του και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, κα Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορα Βιοχημικής Φαρμακολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για το συνεχές ενδιαφέρον και την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, στο Βιολόγο και Επιστημονικό συνεργάτη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Κουβαρά Ευάγγελο, για τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγηση καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας, καθώς και στη Βιοχημικό και Επιστημονικό συνεργάτη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κα Λιάκου Ζωή για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας. Δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κα Ιωάννου Μαρία, για την αμέριστη βοήθεια και συμβολή της στη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λιάσκο Χρήστο, Ιατρό Παθολόγο – Βιολόγο για την πολύτιμη βοήθειά του.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	4
Ευρετήριο εικόνων	7
Ευρετήριο πινάκων	11
Ευρετήριο γραφημάτων	12
Περίληψη	13
Abstract	14
1. Εισαγωγή	15
1.1 Αθηροσκλήρυνση	15
1.2 Πειραματικά Μοντέλα για τη μελέτη της Αθηροσκλήρυνσης	21
1.3 ApoE Knockout ποντίκια	23
1.4 Υδροξυχλωροκίνη	26
1.5 Υδροξυχλωροκίνη και Αθηροσκλήρυνση	28
1.6 Επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1: HIF – 1	31
1.7 HIF – 1α	32
1.8 Ρύθμιση του HIF – 1α εξαρτώμενη από τα επίπεδα του οξυγόνου	35
1.9 Ρύθμιση του HIF – 1α ανεξάρτητη από τα επίπεδα του οξυγόνου	36
1.10 Αθηροσκλήρυνση και HIF – 1α	37
1.11 Σκοπός διπλωματικής εργασίας	39
2. Υλικά και Μέθοδοι	40
2.1 Υδροξυχλωροκίνη	40
2.2 Θεραπευτική αγωγή	40
2.3 Ζώα	40
2.4 Δημιουργία τομών	41
2.5 HIF – 1α ανοσοϊστοχημεία	41
2.6 Έκφραση του HIF – 1α	41
2.7 Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του HIF – 1α	42
2.8 Στατιστική ανάλυση	42
3. Αποτελέσματα	43
3.1 Έκφραση του HIF – 1α	43
3.2 Ποσοτική έκφραση του HIF – 1α	78
3.3 Συσχέτιση της έκφρασης του HIF – 1α με το μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας	
3.4 Συσχέτιση της έκφρασης του HIF – 1α με την έκφραση της eNOS	82

3.4.1 eNOS και αθηροσκλήρυνση	82
3.4.2 Έκφραση της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες ApoE knockout ποντικών	83
4. Συζήτηση	85
Συνοπτομογραφίες	89
Βιβλιογραφία	90

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: Κλινικές εκδηλώσεις αθηροσκλήρυνσης	15
Εικόνα 2: Φυσιολογική δομή του αρτηριακού τοιχώματος.....	15
Εικόνα 3: Τύποι αθηροσκλήρυνσης.....	17
Εικόνα 4: Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων.....	18
Εικόνα 5: <<Αφρώδες>> κύτταρο.....	19
Εικόνα 6: Συνέπειες σχηματισμού αθηροσκληρυντικής πλάκας.....	19
Εικόνα 7: In vitro, in vivo και in silico μοντέλα για τη μελέτη της αθηροσκλήρυνσης.....	21
Εικόνα 8: Δομή της ApoE.....	23
Εικόνα 9: Τύποι λιποπρωτεϊνών.....	24
Εικόνα 10: Απεικόνιση ανάπτυξης καρδιακής νόσου και αθηροσκλήρυνσης σε ApoE knock out ποντίκια.....	26
Εικόνα 11: Υδροξυχλωροκίνη.....	26
Εικόνα 12: Ο κύκλος ζωής του πλασμοδίου.....	26
Εικόνα 13: Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα.....	28
Εικόνα 14: Κλινικές μελέτες για τη χρήση της υδροξυχλωροκίνης και την πρόληψη της θρόμβωσης σε ασθενείς με ΣΕΛ.....	29
Εικόνα 15: Δομή των δύο υπομονάδων του HIF – 1.....	31
Εικόνα 16: Φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχει ο HIF – 1..	32
Εικόνα 17: Μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση σε όγκους που οφείλονται στην υποξία..	33
Εικόνα 18: Ρύθμιση του HIF - 1α εξαρτώμενη από τα επίπεδα του οξυγόνου.....	34
Εικόνα 19: Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF - 1α.....	35
Εικόνα 20: Παρουσία υποξίας στα διάφορα στάδια της αθηροσκλήρυνσης (μπλε χρώμα)36	
Εικόνα 21: Κλίμακα υπολογισμού της έντασης της χρώσης.....	41
Εικόνα 22: Αθηροσκληρυντική πλάκα σε μεγέθυνση 40x. Οι πυρήνες που εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν καφέ χρώμα (μαύρο βέλος) ενώ οι πυρήνες που δεν εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν μπλε χρώμα (μπλε βέλος).....	42
Εικόνα 23: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (CM1, CM2) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	43
Εικόνα 24: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (CM3, CM5) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	44

Εικόνα 25: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (CM6, CM7) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	45
Εικόνα 26: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (CM8, CM9) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	46
Εικόνα 27: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) του αρσενικού ποντικού (CM10) που δεν έλαβε αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	47
Εικόνα 28: Αθηροσκληρυντική πλάκα σε μεγέθυνση 40x. Οι πυρήνες που εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν καφέ χρώμα (μαύρο βέλος) ενώ οι πυρήνες που δεν εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν μπλε χρώμα (μπλε βέλος).....	47
Εικόνα 29: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF1, CF2) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	48
Εικόνα 30: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF3, CF4) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	49
Εικόνα 31: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF5, CF6) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	50
Εικόνα 32: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF7, CF8) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	51
Εικόνα 33: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF9, CF10) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	52
Εικόνα 34: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) του θηλυκού ποντικού (CF12) που δεν έλαβε αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	53
Εικόνα 35: Αθηροσκληρυντική πλάκα σε μεγέθυνση 40x. Οι πυρήνες που εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν καφέ χρώμα (μαύρο βέλος) ενώ οι πυρήνες που δεν εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν μπλε χρώμα (μπλε βέλος).....	53
Εικόνα 36: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM1, HM2) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	54
Εικόνα 37: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM3, HM4) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	55
Εικόνα 38: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM5, HM6) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	56
Εικόνα 39: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM7, HM8) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	57
Εικόνα 40: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM9, HM10) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	58

Εικόνα 41: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM11, HM12) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	59
Εικόνα 42: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM13, HM14) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	60
Εικόνα 43: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM15, HM16) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	61
Εικόνα 44: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM17, HM18) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	62
Εικόνα 45: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM19, HM20) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	63
Εικόνα 46: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM21, HM22) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	64
Εικόνα 47: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) του αρσενικού ποντικού (HM24) που έλαβε αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	65
Εικόνα 48: Αθηροσκληρυντική πλάκα σε μεγέθυνση 40x. Οι πυρήνες που εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν καφέ χρώμα (μαύρο βέλος) ενώ οι πυρήνες που δεν εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν μπλε χρώμα (μπλε βέλος).....	65
Εικόνα 49: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF1, HF2) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	66
Εικόνα 50: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF3, HF4) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	67
Εικόνα 51: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF5, HF6) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	68
Εικόνα 52: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF7, HF8) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	69
Εικόνα 53: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF9, HF10) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	70
Εικόνα 54: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF11, HF12) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	71
Εικόνα 55: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF13, HF15) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	72
Εικόνα 56: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF16, HF17) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	73

Εικόνα 57: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF18, HF19) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	74
Εικόνα 58: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF20, HF21) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	75
Εικόνα 59: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF22, HF23) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	76
Εικόνα 60: Περιοχή αθηροσκληρυντικής πλάκας στα αρσενικά ποντίκια μάρτυρες και στα αρσενικά ποντίκια που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη	80
Εικόνα 61: Περιοχή αθηροσκληρυντικής πλάκας στα θηλυκά ποντίκια μάρτυρες και στα θηλυκά ποντίκια που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη.....	80
Εικόνα 62: Ο ρόλος της eNOS στην αθηροσκλήρυνση.....	82
Εικόνα 63: Έκφραση της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των Control & HCQ treated ApoE knockout ποντικών.....	83

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά ApoE knock out ποντικών.....	25
Πίνακας 2: Επίπεδα έκφρασης HIF - 1α και μέσος όρος έκφρασης του HIF - 1α ανά ομάδα ποντικών.....	77
Πίνακας 3: Μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα έκφρασης HIF – 1α ανά ομάδα ποντικών μαρτύρων.....	77
Πίνακας 4: Μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα έκφρασης HIF – 1α ανά ομάδα ποντικών.....	78
Πίνακας 5: Μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα του μεγέθους της αθηροσκληρυντικής πλάκας σε mm ² ανά ομάδα ποντικών.....	79
Πίνακας 6: Μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα έκφρασης της eNOS ανά ομάδα ποντικών.....	82

Ευρετήριο γραφημάτων

Γράφημα 1: Έκφραση του HIF – 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες ανά ομάδα των ApoE knockout ποντικών.....	78
Γράφημα 2: Μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας σε mm ² ανά ομάδα των ApoE knockout ποντικών.....	79
Γράφημα 3: Έκφραση της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες ανά ομάδα των ApoE knockout ποντικών.....	83

Περίληψη

Η αθηροσκλήρυνση είναι μια παθολογοανατομική βλάβη των αρτηριών που οφείλεται σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις λιποπρωτεΐνες, τα κύτταρα του αίματος και του αρτηριακού τοιχώματος. Αν και η αθηροσκλήρυνση θεωρείται πολυπαραγοντική νόσος, τέσσερις είναι οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου: η αύξηση των λιπιδίων στο αίμα, αιμοδυναμικοί και μηχανικοί παράγοντες της ροής του αίματος που καθιστούν <<ευάλωτο>> το αρτηριακό τοίχωμα, οι παράγοντες πήξης και θρόμβωσης και οι λοιμώξεις.

Οι αθηροσκληρυντικές αλλοιώσεις διακρίνονται σε έξι τύπους, τους τύπους I – VI. Οι τρεις πρώτοι τύποι είναι ασυμπτωματικοί, ενώ στους υπόλοιπους τύπους παρατηρούνται ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις, με σημαντικότερες τη στένωση των αρτηριών και τη ρήξη της αθηροσκληρυντικής πλάκας.

Η συνεχής έρευνα για τη μελέτη της αθηροσκλήρυνσης οδήγησε στη δημιουργία πειραματικών μοντέλων για την καλύτερη μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης. Ένα από τα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στην έρευνα για την αθηροσκλήρυνση είναι το ApoE knockout ποντίκι. Στα ποντίκια αυτά απουσιάζει το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E και παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με τις ανθρώπινες αλλοιώσεις στα διάφορα στάδια της αθηροσκλήρυνσης.

Η υδροξυχλωροκίνη είναι ένα ανθελονοσιακό φάρμακο, που συχνά χρησιμοποιείται ως ανοσορρυθμιστικό για τη θεραπεία ορισμένων αυτοάνοσων νοσημάτων όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος. Οι ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα εμφανίζουν αρτηριοσκληρόνωση πιο συχνά σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Στους ασθενείς αυτούς παρατηρήθηκε ότι η υδροξυχλωροκίνη μπορεί να μειώσει τη LDL χοληστερόλη καθώς και την παραγωγή τριγλυκεριδίων με συνέπεια τη μειωμένη ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χορηγήθηκε υδροξυχλωροκίνη σε ApoE knockout ποντίκια για 16 εβδομάδες και μελετήθηκε η επίδραση του φαρμάκου στο μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας και στην έκφραση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (eNOS) και του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1α (HIF – 1α) στην αθηροσκληρυντική πλάκα. Ο HIF – 1α επιλέχθηκε επειδή απαντάται στην περιοχή της αθηρωματικής πλάκας λόγω της συνεχιζόμενης πάχυνσης του αρτηριακού τοιχώματος.

Με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας παρατηρήθηκε ότι στα ποντίκια που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη, υπήρξε σημαντική αύξηση του μεγέθους της αθηροσκληρυντικής πλάκας και αύξηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών HIF – 1α και eNOS.

Λέξεις κλειδιά: αθηροσκλήρυνση, αθηροσκληρυντική πλάκα, ApoE knockout ποντίκια, υδροξυχλωροκίνη, HIF – 1α, eNOS

Abstract

Atherosclerosis is a pathological lesion of the arteries due to multiple interactions between lipoproteins, blood cells and the arterial wall. Although atherosclerosis is a multifactorial disease, there are four main factors, which play a major role to the initiation and progression of atherosclerosis: hyperlipidemia, hemodynamic factors which make the arterial wall <<susceptible>>, thrombogenic factors and infections.

The atherosclerotic lesions are divided into six types, types I to VI. The first three types are asymptomatic, while the others present with a variety of clinical symptoms, the most important of which are artery stenosis and the rupture of atherosclerotic plaque.

The continuous research on atherosclerosis mechanisms led to the development of various experimental models. Since its introduction in the early 1990s, the apolipoprotein E - deficient mouse has been the most widely studied animal model for atherosclerosis. The outstanding success of this animal model is due to its ready availability, relatively easy breeding and colony maintenance, spontaneous elevated cholesterol levels on a regular chow diet and rapid development of atherosclerotic lesions with histopathological progression, similar to that found in humans. Atherosclerotic plaque appears throughout the arterial tree, with the heaviest plaque seen in the aortic arch.

Hydroxychloroquine is an antimalarial drug which is often used as a second line treatment in certain autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus. Patients with autoimmune diseases develop atherosclerotic lesions more frequently than general population. In these patients, it has been found that hydroxychloroquine can reduce LDL cholesterol and triglyceride production which led to reduced cardiovascular complications, while similar results were found in experiments in mice.

In the present study, hydroxychloroquine was administered to ApoE knockout mice for 16 weeks. At the end of the treatment, it was studied whether the drug had any effect on the size of atherosclerotic plaque. The expression of HIF – 1 α and eNOS in the atherosclerotic plaque was also evaluated. Increased HIF – 1 α expression has been found in the atherosclerotic lesions because of the persistent thickening of arterial wall.

Atherosclerosis area was significantly increased in mice treated with hydroxychloroquine compared to their controls. It was also shown by immunohistochemistry that the expression of HIF – 1 α and eNOS in the atherosclerotic plaque was also augmented in treated mice compared to their controls.

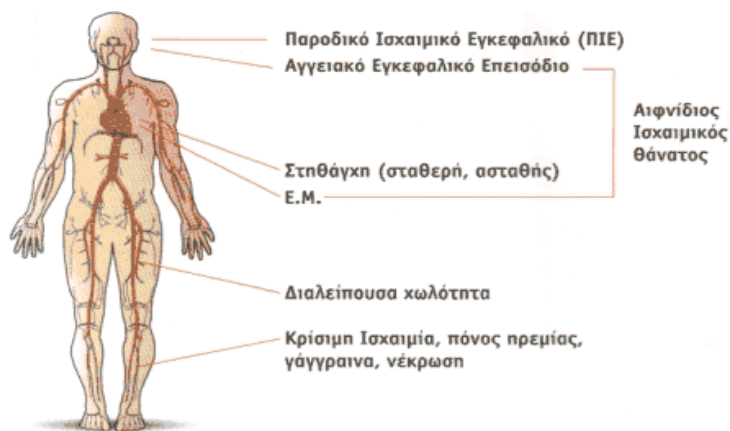
Keywords: Atherosclerosis, atherosclerotic plaque, ApoE knockout, hydroxychloroquine, HIF – 1 α , eNOS

1. Εισαγωγή

1.1 Αθηροσκλήρυνση

Η αθηροσκλήρυνση, επίσης γνωστή και ως αρτηριοσκλήρυνση, είναι μια προοδευτική νόσος των αρτηριών κατά την οποία το τοίχωμα των αρτηριών σκληραίνει ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των λιποπρωτεϊνών, των κυττάρων του αίματος και του αρτηριακού τοιχώματος ⁽¹⁾. Η λέξη αθηροσκλήρυνση προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις <<αθήρη>> και <<σκλήρυνση>> και σημαίνει την πάχυνση των αρτηριών και τη συσσώρευση λιπιδίων που χαρακτηρίζουν την τυπική βλάβη ⁽²⁾.

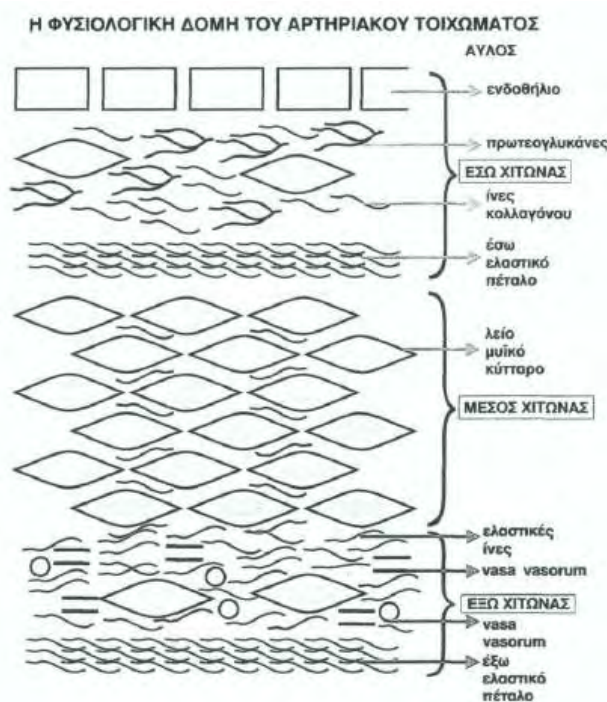
Οι κλινικές εκδηλώσεις της αθηροσκλήρυνσης είναι χαρακτηριστικές και εξαρτώνται από το αγγειακό δίκτυο που προσβάλλεται (Εικόνα 1). Η αθηροσκλήρυνση των στεφανιαίων αρτηριών προκαλεί συνήθως στηθάγχη και έμφραγμα του μυοκαρδίου ενώ η αθηροσκλήρυνση των αρτηριών του εγκεφάλου προκαλεί παροδικά ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια. Στην περιφερική κυκλοφορία, η αθηροσκλήρυνση προκαλεί διαλείπουσα χωλότητα και γάγγραινα και θέτει σε κίνδυνο τη βιωσιμότητα των άκρων. Γενικά, οι αθηροσκληρυντικές βλάβες σχηματίζονται σε σημεία διακλάδωσης των αρτηριών όπου το αίμα αποκτά στροβιλώδη ροή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τοπικοί αιμοδυναμικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εστιακή κατανομή των βλαβών ⁽²⁾.



Εικόνα 1: Κλινικές εκδηλώσεις αθηροσκλήρυνσης

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της νόσου είναι ο τρόπος με τον οποίο η αθηροσκλήρυνση προσβάλλει ένα αρτηριακό τμήμα, ο οποίος ποικίλλει. Συνήθως, θεωρείται ότι τα αθηρώματα είναι στενωτικές βλάβες που προκαλούν περιορισμό της ροής του αίματος και αρτηριακή απόφραξη, ωστόσο η αθηροσκλήρυνση μπορεί επίσης να προκαλέσει την ανάπτυξη ανευρυσματικής νόσου με αύξηση της διαμέτρου του αυλού. Η έκφραση αυτή της αθηροσκλήρυνσης συχνά παρατηρείται στην αορτή, δημιουργώντας προδιάθεση για ρήξη ή διαχωρισμό, παρά στένωση ή απόφραξη ⁽²⁾.

Για να κατανοήσουμε το μηχανισμό της αθηροσκλήρυνσης πρέπει αρχικά να κατανοήσουμε την φυσιολογία της αρτηρίας (Εικόνα 2). Η φυσιολογική αρτηρία αποτελείται



Εικόνα 2: Φυσιολογική δομή του αρτηριακού τοιχώματος ⁽¹⁾

βασικά από τρεις χιτώνες: τον έσω χιτώνα που αποτελείται από μια συνεχόμενη στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που διατηρεί την αιματική ροή στην κυκλοφορία (αντιθρομβωτική δράση), δρα σαν μεταφορέας για την είσοδο υλικών από την κυκλοφορία και ρυθμίζει τη λειτουργία των λείων μυϊκών κυττάρων, το μέσο χιτώνα που αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα που συσπώνται και ρυθμίζουν τον τόνο του αγγειακού τοιχώματος και τη μεσοκυττάρια ουσία ή ινίδια τα οποία έχουν υποστηρικτικό ρόλο και τέλος, τον έξω χιτώνα που αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό ⁽³⁾.

Η αθηροσκλήρυνση θεωρείται μια πολυπαραγοντική νόσος, ωστόσο τέσσερις θεωρούνται οι βασικοί παράγοντες για την εξέλιξή της ⁽¹⁾:

1. Η αύξηση των λιπιδίων στο αίμα που εισέρχονται σε αυξημένα ποσά στον έσω χιτώνα.
2. Αιμοδυναμικοί και μηχανικοί παράγοντες της ροής του αίματος που καθιστούν ευάλωτο το αρτηριακό τοίχωμα στην αθηροσκλήρυνση.
3. Οι παράγοντες πήξης και θρόμβωσης που συμμετέχουν στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, αλλά ευθύνονται και άμεσα για τα οξέα στεφανιαία συμβάματα.
4. Οι λοιμώξεις που πυροδοτούν αντιδράσεις φλεγμονής και επούλωσης στο αρτηριακό τοίχωμα, στοιχεία που εμπλέκονται άμεσα στη διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης ⁽¹⁾. Ο ρόλος της φλεγμονής και του ανοσοποιητικού συστήματος, στη διαδικασία δημιουργίας αθηροσκλήρυνσης, βρίσκονται τα τελευταία χρόνια στο επίκεντρο των ερευνών αφού θεωρείται ότι η κατανόηση των ρόλων των δύο αυτών παραγόντων θα βοηθήσει τόσο στην κλινική αντιμετώπιση της νόσου όσο και στην πρόληψή της ⁽⁴⁾.

Στα αρχικά στάδια, η αθηροσκλήρυνση χαρακτηρίζεται από συγκέντρωση λιπιδίων, κυρίως εστέρων χοληστερόλης στον έσω χιτώνα των αρτηριών και συσσώρευση μακροφάγων που προσλαμβάνουν τη χοληστερόλη και μετατρέπονται σε <<αφρώδη>> κύτταρα. Σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου παρατηρείται πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων που μεταναστεύουν από το μέσο στον έσω χιτώνα και αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει στον έσω χιτώνα. Το αποτέλεσμα όλων αυτών είναι ο σχηματισμός αθηροσκληρυντικής πλάκας. Στην αθηροσκληρυντική πλάκα υπάρχει ένα «μαλακό» στοιχείο, η χοληστερόλη και τα αφρώδη κύτταρα, και ένα «σκληρό», τα λεία μυϊκά κύτταρα και το κολλαγόνο ⁽¹⁾.

Παθολογοανατομικά διακρίνονται έξι τύποι αθηροσκλήρυνσης (Τύπος I – VI) (Εικόνα 3), που θεωρούνται συνεχόμενα εξελικτικά στάδια ⁽¹⁾:

Α) Τύπος I: υπάρχει περιορισμένη εναπόθεση λιπιδίων στον έσω χιτώνα με μικρές ομάδες αφρώδων κυττάρων. Τέτοιες αλλοιώσεις έχουν παρατηρηθεί σε ενήλικες, παιδιά και βρέφη. Οι βλάβες συνήθως δεν είναι μακροσκοπικά ορατές.

Β) Τύπος II: η βλάβη περιέχει περισσότερα αφρώδη κύτταρα, μερικά λεία μυϊκά κύτταρα με σταγονίδια λίπους και μικρή ποσότητα εξωκυττάριας χοληστερόλης, στη θεμέλια ουσία του έσω χιτώνα. Μακροσκοπικά, οι αλλοιώσεις φαίνονται σαν κίτρινες ραβδώσεις ή κηλίδες

(λόγω της εναπόθεσης του λίπους). Τέτοιες αλλοιώσεις παρατηρούνται σχεδόν πάντα σε παιδιά στην αορτή και σε εφήβους στα στεφανιαία αγγεία.

Ωστόσο, δεν εξελίσσονται όλες οι βλάβες τύπου II σε πιο προχωρημένα στάδια αθηροσκλήρυνσης. Οι παράγοντες που καθορίζουν την εξέλιξή τους είναι τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα και η θέση της βλάβης, το αν δηλαδή βρίσκεται σε περιοχή αυξημένης ταχύτητας του αίματος, οπότε αυξάνεται η πιθανότητα εισόδου της χοληστερόλης στον έσω χιτώνα.

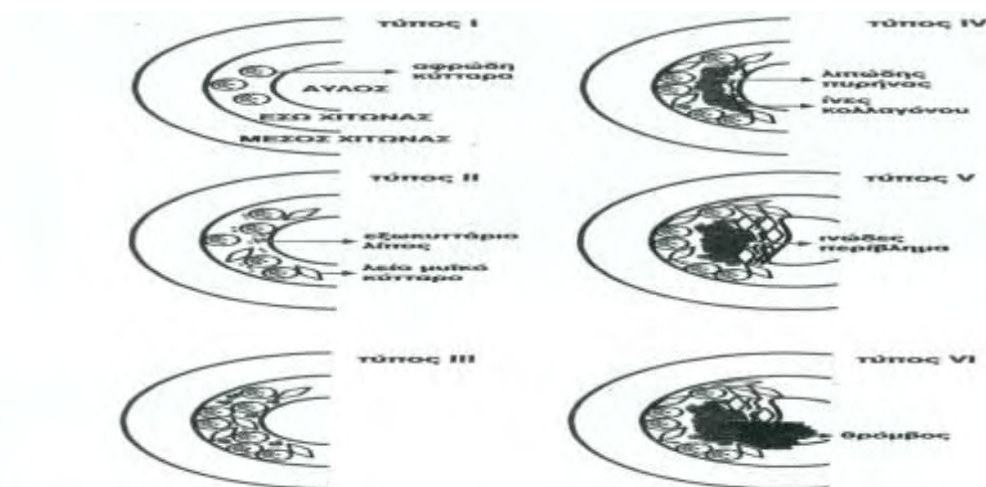
Γ) Τύπος III: αυξάνεται ο αριθμός των αφρωδών κυττάρων και η εξωκυττάρια εναπόθεση λίπους.

Οι τρεις παραπάνω τύποι είναι ασυμπτωματικοί. Ο τύπος III θεωρείται το μεταβατικό στάδιο από τις <<φυσιολογικές>>, δηλαδή τις κοινές στο γενικό πληθυσμό αθηρωματικές αλλοιώσεις, στις πιο προχωρημένες βλάβες (Τύποι IV – VI), που είναι αυτές που προκαλούν τις κλινικές εκδηλώσεις.

Δ) Τύπος IV: υπάρχει σημαντική ποσότητα εξωκυττάριας λίπους που σχηματίζει το λιπώδη πυρήνα μέσα στον έσω χιτώνα. Στο λιπώδη πυρήνα εντοπίζονται κυτταρικά υπολείμματα από <<νεκρά>> αφρώδη κύτταρα και μικρές ποσότητες ινών κολλαγόνου. Ταυτόχρονα, συνεχίζεται η συσσώρευση μακροφάγων και λείων μυϊκών κυττάρων στον έσω χιτώνα.

Ε) Τύπος V: χαρακτηρίζεται από σημαντική εναπόθεση συνδετικού ιστού, κυρίως κολλαγόνου, που σχηματίζει το ινώδες περίβλημα της πλάκας. Συχνά παρατηρείται και δημιουργία νέων αγγείων στην πλάκα και επέκτασή της. Αυτή είναι η τελική σύνθεση της αθηροσκληρυντικής πλάκας με τα δύο χαρακτηριστικά στοιχεία: το λιπώδη πυρήνα και το ινώδες περίβλημα.

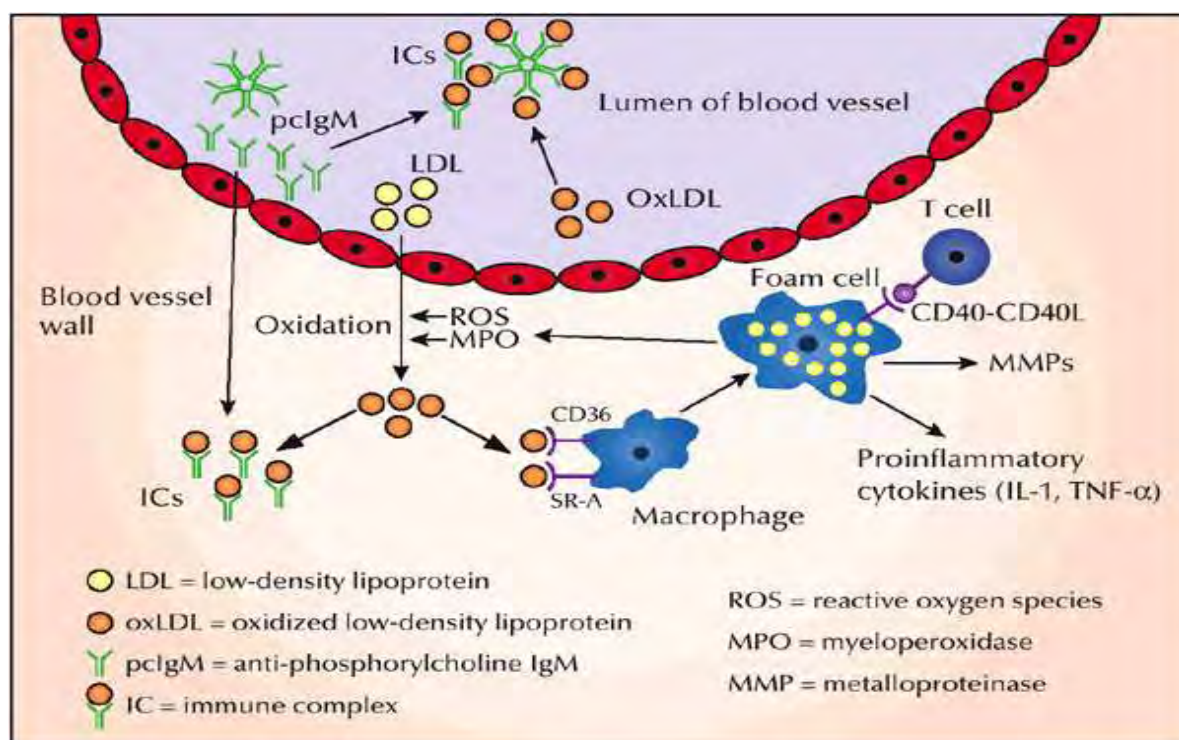
ΣΤ) Τύπος VI: οι αθηροσκληρυντικές πλάκες είναι επιρρεπείς σε ρήξεις του ενδοθηλίου και του ινώδους περιβλήματος. Σε αυτήν την περίπτωση, ο λιπώδης πυρήνας εκτίθεται στα στοιχεία του αίματος, προκαλώντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης (λόγω των συστατικών του λιπώδους πυρήνα), με αποτέλεσμα τη θρόμβωση ⁽¹⁾.



Τα εξελικτικά στάδια της αθηροσκλήρωσης.

Εικόνα 3: Τύποι αθηροσκλήρυνσης ⁽¹⁾

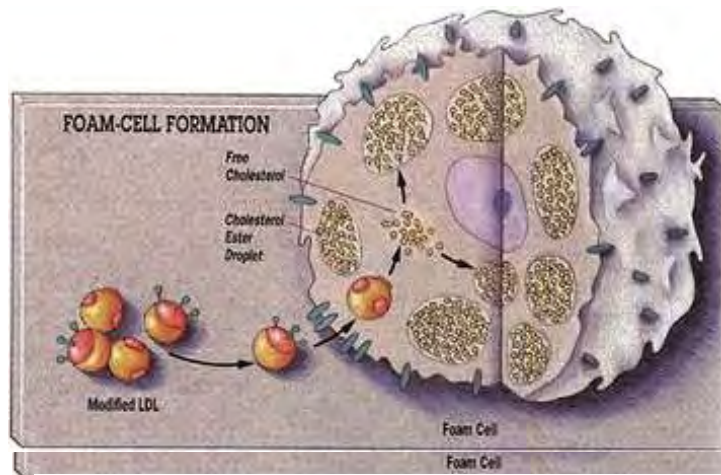
Πώς όμως σχηματίζονται τα αφρώδη κύτταρα που τελικά οδηγούν στη δημιουργία της αθηροσκληρυντικής πλάκας (Εικόνα 4);



Εικόνα 4: Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων⁽⁵⁾

Η διαδικασία της αθηροσκληρυντικής βλάβης οφείλεται σε βλάβη του ενδοθηλίου. Παράγοντες που μπορούν να βλάψουν το ενδοθήλιο θεωρούνται: α) η υπερχοληστερολαιμία, κατά την οποία παρατηρείται αυξημένο ποσοστό της LDL χοληστερόλης (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη) να εισέρχεται στον έσω χιτώνα, όπου οξειδώνεται με αποτέλεσμα να προκαλούνται κυτταροτοξικές δράσεις στο ενδοθήλιο, β) διαταραχές της αιματικής ροής, όπως οι στροβιλισμοί σε σημεία κάμψης ή διακλάδωσης των αρτηριών και η αργή ροή του αίματος σε τμήματα του αρτηριακού δέντρου που μπορούν να προκαλέσουν μικρές αρχικά βλάβες στο ενδοθήλιο, γ) η φλεγμονώδης αντίδραση ως συνέπεια μικροβιακής ή ιογενούς λοίμωξης, δ) το κάπνισμα, ε) ο αγγειόσπασμος που προκαλεί μηχανική βλάβη λόγω αυξημένης ταχύτητας της ροής του αίματος⁽¹⁾.

Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι η αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου, η πρόσδεση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο λόγω έκφρασης στην επιφάνειά του διαφόρων μορίων πρόσδεσης, όπως είναι το VCAM – 1 (μόριο προσκόλλησης στα αγγειακά κύτταρα – 1), η οποία φυσιολογικά δεν ευνοείται⁽⁴⁾ και η είσοδος της LDL χοληστερόλης και υπολειμμάτων λιποπρωτεϊνών και μονοκυττάρων στον έσω χιτώνα. Εκεί, η LDL οξειδώνεται (oxLDL) από τις δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και είτε φαγοκυτταρώνεται από τα μακροφάγα είτε προσλαμβάνεται από τους υποδοχείς <<ρακοσυλλέκτες>> των μακροφάγων (CD36, SR – A), με συνέπεια τη μετατροπή των τελευταίων σε αφρώδη κύτταρα (Εικόνα 5). Τα αφρώδη κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP) και εκφράζουν μόρια όπως το CD40 για την περαιτέρω ενεργοποίηση των T – κυττάρων. Αυτό έχει ως

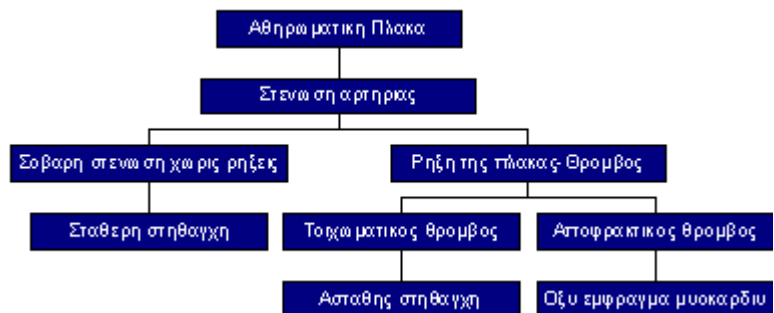


Εικόνα 5: <<Αφρώδες>> κύτταρο

συνέπεια τον
πολλαπλασιασμό τους.
Επιπλέον, τα αφρώδη
κύτταρα παράγουν μεγάλες
ποσότητες
μυελοϋπεροξειδάσης (MPO),
ενός ενζύμου που παράγει
ελεύθερες ρίζες οξυγόνου,
ευνοώντας έτσι την οξείδωση
της LDL χοληστερόλης, με
αποτέλεσμα τη δημιουργία
ενός φαύλου κύκλου.

Πολλά αφρώδη κύτταρα νεκρώνονται, και τα υπολείμματά τους προκαλούν επιπλέον συσσώρευση T-λεμφοκυττάρων και όταν έρθουν σε επαφή με το αίμα πυροδοτούν το μηχανισμό πήξης ⁽¹⁾. Η ίδια η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη αυξάνει την παραγωγή του ιστικού παράγοντα, ο οποίος αποτελεί τον κύριο θρομβογόνο παράγοντα στις αθηροσκληρυντικές πλάκες ⁽⁴⁾, και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 ⁽¹⁾.

Καθώς η βλάβη εξελίσσεται, η συνεχής είσοδος χοληστερόλης στον έσω χιτώνα προκαλεί την εξωκυττάρια συσσώρευσή της στη θεμέλια ουσία και το σχηματισμό του λιπώδους πυρήνα. Τα λεία μυϊκά κύτταρα του έσω χιτώνα, υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών, αλλά και της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης, ενεργοποιούνται και εκκρίνουν κολλαγόνο που μαζί με τα λεία μυϊκά κύτταρα σχηματίζει το ινώδες περίβλημα της πλάκας ⁽¹⁾. Η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη ελαττώνει και το νιτρικό οξείδιο (NO), που παράγεται από το ενδοθήλιο το οποίο αποτελεί το κύριο αγγειοδιασταλτικό μόριο με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που περιορίζει την έκφραση του VCAM-1. Το NO αποτελεί επίσης έναν ισχυρό αναστολέα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ⁽⁴⁾ οπότε η μείωσή του προδιαθέτει έμμεσα στο σχηματισμό θρόμβου στην πλάκα ⁽¹⁾.



Εικόνα 6: Συνέπειες σχηματισμού αθηροσκληρυντικής πλάκας

Με βάση τα παραπάνω, η αθηροσκλήρυνση φαίνεται ότι έχει ως αιτία έναρξης τη βλάβη του ενδοθηλίου, αλλά στη συνέχεια η διαδικασία αυτοσυντηρείται με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος και του αίματος, της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης, των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων ⁽¹⁾.

Ο σχηματισμός και η συνεχής αύξηση της αθηροσκληρυντικής πλάκας προκαλεί στένωση των στεφανιαίων αρτηριών και κλινική εμφάνιση στηθάγχης (Εικόνα 6). Τελικά, μπορεί να συμβεί πλήρης απόφραξη της αρτηρίας, η οποία δεν οδηγεί απαραίτητα σε

κλινική συμπτωματολογία, καθόσον μπορεί να έχει αναπτυχθεί επαρκής παράπλευρη κυκλοφορία. Το μεγαλύτερο ποσοστό των στεφανιαίων βλαβών οφείλονται σε αυτή την προοδευτική αύξηση της πλάκας (Τύπος V). Παρόλα αυτά, το 75% των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων (έμφραγμα, ασταθής στηθάγχη, αιφνίδιος ισχαιμικός θάνατος από αρρυθμία) οφείλονται σε ρήξη της πλάκας και θρόμβωση (Τύπος VI) που προκαλεί απότομα μεγάλη στένωση ή απόφραξη της αρτηρίας. Στο υπόλοιπο 25% των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων προκαλούνται διαβρώσεις της πλάκας χωρίς πραγματική ρήξη, που και αυτές όμως προκαλούν θρόμβωση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το μέγεθος της πλάκας είναι συνήθως μεγάλο και προκαλεί ήδη σημαντική στένωση της αρτηρίας ⁽¹⁾.

1.2 Πειραματικά Μοντέλα για τη μελέτη της Αθηροσκλήρυνσης

Πρόσφατα μοντέλα για την μελέτη της αθηροσκλήρυνσης				
	Μοντέλο	Χαρακτηριστικά	Μειονεκτήματα	Χρήση
In vitro μοντέλα	Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία	Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία/κλινικά σημαντική	Ελλειψη δυναμικής αλληλεπίδρασης κυτταρικών/χημικών παραγόντων	Μελέτες για παράγοντες που προκαλούν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στην αθηροσκλήρυνση
	Καλλιέργεια αναπτυσσόμενων αρτηριών	Διακυτταρική αλληλεπίδραση	Δυσκολία στην κατανόηση της συμβολής των διαφορετικών κυτταρικών τύπων	Μελέτες μηχανισμών σε μέτρια πολύπλοκες αποικίες
In vivo μοντέλα	Αθηροσκλήρυνση	Ταχεία και χωρό - ελεγχόμενη αρτηριοσκλήρυνση	Αργή ανάπτυξη αρτηριοσκλήρυνσης	Παράγοντες-μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αρτηριοσκλήρυνση
	Μηχανική/Χημική αστάθεια πλάκας	Χρονικά ελεγχόμενη - χαρακτηριστικά ασταθούς πλάκας	Μη αυτόματη ρήξη πλάκας όπως παρατηρείται στους ανθρώπους	Μηχανισμοί/Παράγοντες που συμβάλλουν στη ρήξη της πλάκας
	Αυτόματη αστάθεια πλάκας	Χαρακτηριστικά ασταθούς πλάκας - αυθόρμητα	Δεν υπάρχει πραγματική ρήξη πλάκας	Μηχανισμοί/Παράγοντες που συμβάλλουν στη ρήξη της πλάκας
	(Μοριακή) τεχνική απεικόνισης	Παρακολούθηση ανάπτυξης της ασθένειας/Χρήση για ανάπτυξη θεραπείας	Ακριβή	Μελέτες παρακολούθησης της ανάπτυξης της νόσου
	Μεταμόσχευση μυελού των οστών	Διαφορετικά αποτελέσματα των προγονικών κυττάρων, τα οποία μπορεί να είναι γενετικώς τροποποιημένα	Διαφορετικά αποτελέσματα στα διάφορα ζώα	Μελέτες συνεισφοράς των προγονικών κυττάρων στην αθηροσκλήρυνση
	Κουνέλι/μόσχευμα φλέβας	Χρήση διάφορων αγγειακών κατασκευών, μελέτη του μόσχευματος, προσαρμογή σε διάφορες συνθήκες	Τεχνικές δυσκολίες σε μικρότερα ζώα	Μελέτες μεταμόσχευσης αθηροσκλήρυνσης με τη συμμετοχή αιμοδυναμικών παραγόντων
	Ποντίκι/μόσχευμα αρτηρίας	Χειρουργική διαδικασία-μειώνει την ισχαιμία και την επαναιμάτωση της βλάβης	Τα αγγειακά τμήματα του δότη πρέπει να είναι μεγάλα	Μηχανισμοί/Παράγοντες που συμβάλλουν στην αθηροσκλήρυνση
	Αρουραίος/αθηροσκληρυνση	Ταχεία μεταμόσχευση αθηροσκληρυντικών πλακών	Αδυναμία αργής ανάπτυξης της νόσου	Μηχανισμοί/Παράγοντες που συμβάλλουν στην αθηροσκλήρυνση
	QTL-ανάλυση	Γενετική προσέγγιση για τον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο	Επίπονη, χρονοβόρα	Αναζήτηση γονιδίων που σχετίζονται με την αθηροσκλήρυνση
In silico μοντέλα	In silico QTL-ανάλυση	Ταχεία ανάλυση, λιγότερα ποντίκια	Επίπονη	Αναζήτηση γονιδίων που σχετίζονται με την αθηροσκλήρυνση

Εικόνα 7: In vitro, in vivo και in silico μοντέλα για τη μελέτη της αθηροσκλήρυνσης⁽⁶⁾

Η έρευνα για τη μελέτη της αθηροσκλήρυνσης, όπως και άλλων ασθενειών, οδήγησε στη δημιουργία πειραματικών μοντέλων (συνήθως ζωικών). Ένα ζωικό πειραματικό μοντέλο είναι ένας οργανισμός ο οποίος πάσχει από μια ασθένεια που είναι παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται στον άνθρωπο⁽⁷⁾.

Τα ζωικά μοντέλα δημιουργήθηκαν ώστε να υπάρξει καλύτερη κατανόηση της παθογένειας των ασθενειών και αποτελούν πλέον ένα χρήσιμο <<εργαλείο>> για την βελτίωση της διάγνωσης, πρόληψης και θεραπείας⁽⁸⁾.

Η χρήση ζωικών οργανισμών στην έρευνα για την αθηροσκλήρυνση ξεκίνησε πριν περίπου 100 χρόνια και θεωρείται πλέον απαραίτητη ώστε να απαντηθούν πολλά ερωτήματα σχετικά με τη νόσο. Παραδείγματος χάριν, η αξιολόγηση ενός παράγοντα κινδύνου ως μια ανεξάρτητη μεταβλητή, μπορεί να πραγματοποιηθεί καλύτερα σε ζωικούς οργανισμούς, που γνωρίζουμε εκ των προτέρων ότι είναι απαλλαγμένοι από άλλες ασθένειες ή γενετικές ανωμαλίες. Από την άλλη πλευρά, παράγοντες όπως η αγγειακή βλάβη, οι αυτοάνοσες απαντήσεις, η χρήση φλεβικών μοσχευμάτων μπορούν να διερευνηθούν αυτόνομα ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες και να μελετηθούν οι τυχόν επιπτώσεις τους στον οργανισμό. Επιπλέον, περάματα που χρησιμοποιούν ζωικά μοντέλα αποτελούν τον μόνο τρόπο για την ανάπτυξη νέων μεθόδων διάγνωσης, πρόληψης και θεραπείας, αφού ο ερευνητής μπορεί να επιλέξει το είδος του οργανισμού, τις πειραματικές συνθήκες, τις μεθόδους καθώς και την απόκτηση ιστών και δειγμάτων, κάτι που δεν μπορεί να συμβεί σε ανθρώπινες πειραματικές (κλινικές) μελέτες⁽⁸⁾.

Αν και ακόμα δεν έχει δημιουργηθεί το πρότυπο ζωικό μοντέλο για την μελέτη της αθηροσκλήρυνσης, που να αναπαράγει πλήρως τα στάδια που παρατηρούνται στον άνθρωπο, η διατροφή με χοληστερόλη και η μηχανική βλάβη του ενδοθηλίου είναι δύο κοινά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στα περισσότερα ζωικά μοντέλα της αθηροσκλήρυνσης⁽⁷⁾. Τα πειραματικά μοντέλα της αθηροσκλήρυνσης (Εικόνα 7) αναπτύσσουν αθηροσκληρυντικές πλάκες είτε αυτόματα, είτε με εξωγενείς παρεμβάσεις (δίαιτα, μηχανικά και χημικά μέσα). Πολλά ζώα έχουν χρησιμοποιηθεί στην έρευνα για την αθηροσκλήρυνση, όπως χοίροι, ινδικά χοιρίδια, ποντίκια, κουνέλια και χάμστερ. Με την έλευση της γενετικής μηχανικής, διαγονιδιακά μοντέλα ζώων χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως⁽⁹⁾.

Το κουνέλι είναι από τους πρώτους οργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη της αθηροσκλήρυνσης. Οι πρώτες αναφορές σχετικά με τη χρήση του έγιναν το 1908, όταν παρατηρήθηκε ότι κουνέλια που ακολουθούσαν δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη ήταν πολύ ευαίσθητα στη δημιουργία αθηροσκληρυντικών βλαβών. Παρόλο που το κουνέλι παρουσιάζει πολλές διαφορές με τον άνθρωπο, θεωρείται ακόμα και σήμερα ένα από τα πιο σημαντικά ζωικά μοντέλα για τη μελέτη της αθηροσκλήρυνσης λόγω του χαμηλού του κόστους. Γι' αυτό το λόγο, έχουν δημιουργηθεί και διαγονιδιακά κουνέλια με στόχο τη διαλεύκανση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου⁽⁷⁾.

Ο αρουραίος και το ποντίκι είναι δύο ακόμα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα για την αθηροσκλήρυνση. Αν και γενικά τα ποντίκια θεωρούνται ανθεκτικά στην αθηροσκλήρυνση, με τη χρήση μεθόδων γενετικής μηχανικής επιτεύχθηκε η δημιουργία ποντικών που παρουσιάζουν διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων,

όπως είναι τα ApoE knockout ποντίκια και τα ποντίκια στα οποία απουσιάζει ο υποδοχέας της LDL χοληστερόλης. Τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν αθηροσκλήρυνση αυτόματα και μια δίαιτα πλούσια σε χοληστερόλη μπορεί να επιταχύνει την εξέλιξη της νόσου ⁽⁷⁾. Ένα καινούργιο μοντέλο ποντικίου που χρησιμοποιείται στη μελέτη της αθηροσκλήρυνσης είναι το ApoE*3Leiden (E3L) διαγονιδιακό ποντίκι στο οποίο έχει εισαχθεί μια μεταλλαγμένη μορφή του ανθρώπινου γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E. Τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν υπερλιπιδαιμικό φαινότυπο, αναπτύσσουν αρτηριοσκλήρυνση όταν τρέφονται με διαίτα πλούσια σε χοληστερόλη και είναι πιο ευαίσθητα στα υπολιπιδαιμικά φάρμακα σε σύγκριση με τα ApoE knockout ποντίκια ⁽¹⁰⁾.

Οι χοίροι, επίσης, χρησιμοποιούνται συχνά ως ζωικά μοντέλα λόγω της ομοιότητας που εμφανίζουν με τον άνθρωπο στη μεταφορά της χοληστερόλης στην κυκλοφορία μέσω της LDL. Συνήθως χρησιμοποιούνται για τη μελέτη διατροφικών παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη της νόσου ή ακόμα και προφυλάσσουν εν μέρει από αυτή ⁽⁷⁾. Τέλος, το χάμστερ, ένα από τα πιο πρόσφατα χρησιμοποιούμενα ζωικά μοντέλα, εμφανίζει παρόμοια χαρακτηριστικά με τον άνθρωπο, σε σχέση με την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης, μετά από δίαιτα εμπλουτισμένη σε χοληστερόλη και κορεσμένα λιπαρά ⁽⁷⁾.

1.3 ApoE Knockout ποντίκια

Η απολιποπρωτεΐνη E (ApoE) (Εικόνα 8) είναι μια πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στα χυλομικρά και στις VLDLs (πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες). Πιο συγκεκριμένα, η ApoE αποτελεί προσδέτη λιποπρωτεϊνών (Εικόνα 9) και παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα στον καταβολισμό των τριγλυκεριδίων ⁽⁹⁾. Ο ρόλος της ApoE είναι να συνδέεται με τα υπολείμματα



Εικόνα 8: Δομή της ApoE

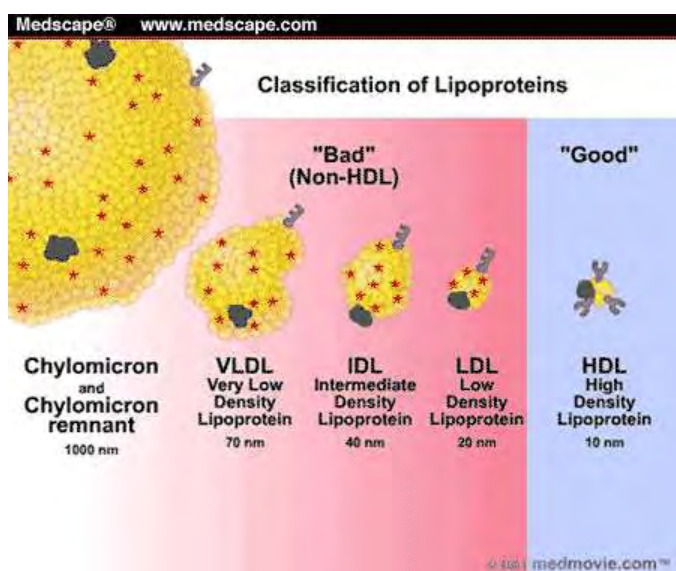
χυλομικρών και των VLDLs, συμμετέχοντας έτσι στην απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία του αίματος μέσω του υποδοχέα της LDL. Επίσης, η ApoE συνδέεται με HDL (υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη) σωματίδια και μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα SR – BI επιτρέπει τη μεταφορά της χοληστερόλης στο ήπαρ ⁽¹¹⁾. Επομένως, τα ApoE knockout ποντίκια (ποντίκια που στερούνται το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E) αποτελούν ένα ιδανικό μοντέλο, τόσο για τη μελέτη της υπερχοληστερολαιμίας όσο και της αθηροσκλήρυνσης ⁽¹²⁾.

Η ApoE αναγνωρίστηκε αρχικά για το σημαντικό ρόλο που παίζει στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και τη συσχέτιση της με τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Πιο πρόσφατα, έχει μελετηθεί ο ρόλος της σε πολλές βιολογικές διαδικασίες που δεν σχετίζονται άμεσα με την μεταφορά των λιποπρωτεϊνών, όπως είναι η νόσος του Alzheimer (AD).

Η πρωτεΐνη ApoE αποτελείται από 299 αμινοξέα και συμμετέχει στη μεταφορά των λιποπρωτεϊνών, των λιποδιαλυτών βιταμινών και της χοληστερόλης στο λεμφικό σύστημα

και στη συνέχεια στο αίμα. Η απολιποπρωτεΐνη Ε συντίθεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά έχει βρεθεί επίσης και σε άλλους ιστούς όπως ο εγκέφαλος καθώς επίσης και σε κύτταρα, όπως τα μακροφάγα⁽¹¹⁾.

Η ΑρoΕ χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 19, σε ένα σύμπλεγμα με τις απολιποπρωτεΐνες C1 και C2. Το γονίδιο της ΑρoΕ αποτελείται από τέσσερα εξόνια και τρία ιντρόνια, συνολικού μήκους 3597 ζευγών βάσεων και στους ανθρώπους υπάρχει σε τρεις ισομορφές, ε2, ε3 και ε4⁽¹³⁾.



Εικόνα 9: Τύποι λιποπρωτεϊνών⁽⁴⁴⁾

εμφάνιση αθηροσκλήρυνσης. Σε ποντίκια, στα οποία απουσιάζει το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης Ε (ΑρoΕ knockout), τα επίπεδα της χοληστερόλης είναι αυξημένα και οι αθηρωματικές πλάκες αναπτύσσονται μέσα σε 10 εβδομάδες, ακόμα και αν τα ποντίκια αυτά ακολουθούν μία φυσιολογική διαίτα σε λιπαρά. Η αθηροσκλήρυνση μπορεί να μειωθεί σε αυτά τα ποντίκια με τη μεταφορά του γονιδίου της ΑρoΕ μέσω ενός ανασυνδυασμένου αδενοϊού, ή με την έκφραση διαφόρων διαγονιδίων της ΑρoΕ ή με τη μεταφορά ενός πεπτιδίου που μιμείται τη δράση της ΑρoΕ⁽¹¹⁾.

Επιπλέον, σειρά μελετών έχουν δείξει ότι η ΑρoΕ έχει έναν επιπλέον προστατευτικό ρόλο έναντι της αθηροσκλήρυνσης, ο οποίος είναι διαφορετικός από το ρόλο που παίζει στην ομοιοστασία της χοληστερόλης. Η ΑρoΕ συναντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις αθηρωματικές πλάκες και θεωρείται ότι κυρίως προέρχεται από τα μακροφάγα που υπάρχουν στις αθηροσκληρυντικές πλάκες. Η ωφέλιμη επίδραση της έκφρασης της ΑρoΕ από τα μακροφάγα έχει τεκμηριωθεί επαρκώς με αρκετές ζωικές μελέτες. Μεταμόσχευση μυελού των οστών έδειξε ότι η ΑρoΕ που συντίθεται από τα μακροφάγα έχει αντι-αθηρογόνο δράση και ότι η ιδιότητα αυτή είναι ανεξάρτητη από τη δράση της ΑρoΕ στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα. Επιπλέον, ποντίκια, τα οποία είχαν ως μόνη πηγή ΑρoΕ, τα μακροφάγα, δεν παρουσίαζαν αθηροσκλήρυνση, παρόλο που είχαν χαμηλά επίπεδα ΑρoΕ στο πλάσμα και υψηλή χοληστερόλη. Τέλος, όταν τα επίπεδα της ΑρoΕ ήταν

φυσιολογικά σε όλους τους ιστούς εκτός από τα μακροφάγα, τα ποντίκια ήταν πιο ευαίσθητα στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης⁽¹¹⁾.

Η ApoE, που προέρχεται από τα μακροφάγα, παρουσιάζει τοπικά δράση κυτταροκινών και ορμονών. Έτσι, η ApoE που προέρχεται από τα μακροφάγα, συμβάλλει στο γενικότερο αντι – αθηροσκληρυντικό ρόλο της ApoE. Η ApoE αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και την έκφραση του μορίου προσκόλλησης στα αγγειακά κύτταρα – 1 (VCAM – 1) στα επιθηλιακά κύτταρα ενεργοποιώντας το μονοπάτι σύνθεσης του νιτρικού οξειδίου⁽¹¹⁾.

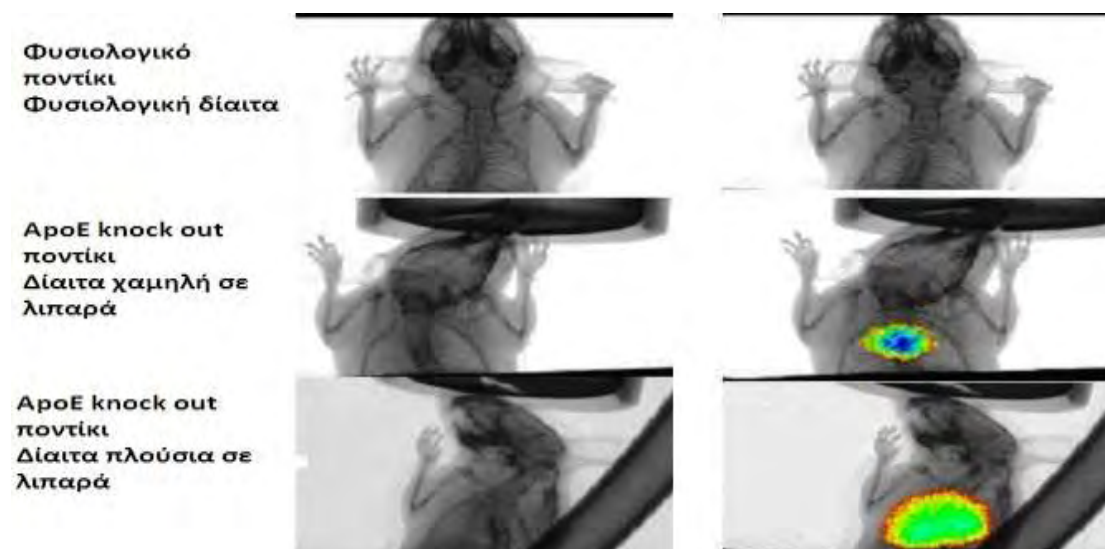
Η ApoE μπορεί να αναστείλει επίσης την οξείδωση των λιπαρών οξέων, εμποδίζοντας έτσι τη συσσώρευση των οξειδωμένων LDL. Τα ApoE knockout ποντίκια παρουσιάζουν αυξημένο οξειδωτικό στρες και συσσωρεύουν περισσότερη οξειδωμένη LDL στην αορτή, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σοβαρών αλλοιώσεων ενώ οι λιποπρωτεΐνες στο πλάσμα τους είναι πιο επιρρεπείς στην οξείδωση in vitro σε σχέση με τα wild type πειραματόζωα⁽¹¹⁾.

Τα πρώτο ApoE knockout ποντίκι δημιουργήθηκε το 1992 ταυτόχρονα από δύο εργαστήρια: το Smithies' Department (Dr Nobuyo Maeda) (University of North Carolina) και το Rockefeller University και μέχρι σήμερα τα ApoE knockout ποντίκια θεωρούνται ιδανικά ζωικά μοντέλα για την μελέτη της αθηροσκλήρυνσης, αφού στα ποντίκια αυτά παρατηρείται όλο το φάσμα των αλλοιώσεων κατά τη διάρκεια ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης και οι αλλοιώσεις αυτές είναι παρόμοιες με αυτές που παρουσιάζουν και οι άνθρωποι⁽¹⁴⁾. Στα ApoE (Πίνακας 1) τα επίπεδα της χοληστερόλης είναι αυξημένα κατά 5 – 8 φορές περισσότερο, σε σύγκριση με τα αγρία τύπου ποντίκια και επιπλέον αναπτύσσουν αυτόματα σοβαρή αθηροσκλήρυνση ακόμα και αν ακολουθούν δίαιτα χαμηλή σε λιπαρά (Εικόνα 10). Οι αθηροσκληρυντικές αλλοιώσεις αρχίζουν να γίνονται εμφανείς από την 8^η εβδομάδα ενώ γίνονται σοβαρότερες όσο προχωράει η ανάπτυξη του ζώου. Τέλος, στα ApoE knockout ποντίκια, είναι εμφανή όλα τα στάδια εμφάνισης της νόσου (Τύπος Ι – VI)⁽⁹⁾.

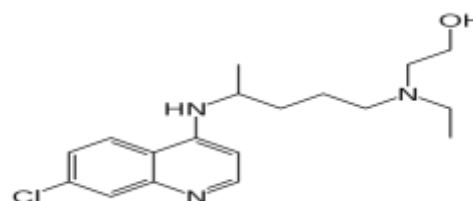
Χαρακτηριστικά των ApoE knock out ποντικών

1	Ομόζυγα για την μετάλλαξη του ApoE γονιδίου
2	Πλήρης απουσία της απολιποπρωτεΐνης E
3	Αυξημένα επίπεδα της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος
4	Σχετικά φυσιολογικά επίπεδα τριγλυκεριδίων
5	Μετατόπιση της κανονικής κατανομής των λιπιδίων από τις HDL στις VLDL και IDL
6	Πρόωρη, αυτόματη και σοβαρή ανάπτυξη αθηροσκληρυντικών αλλοιώσεων
7	Φυσιολογική αναπαραγωγική ικανότητα μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ApoE knock out ποντικών

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά ApoE knock out ποντικών⁽¹⁵⁾

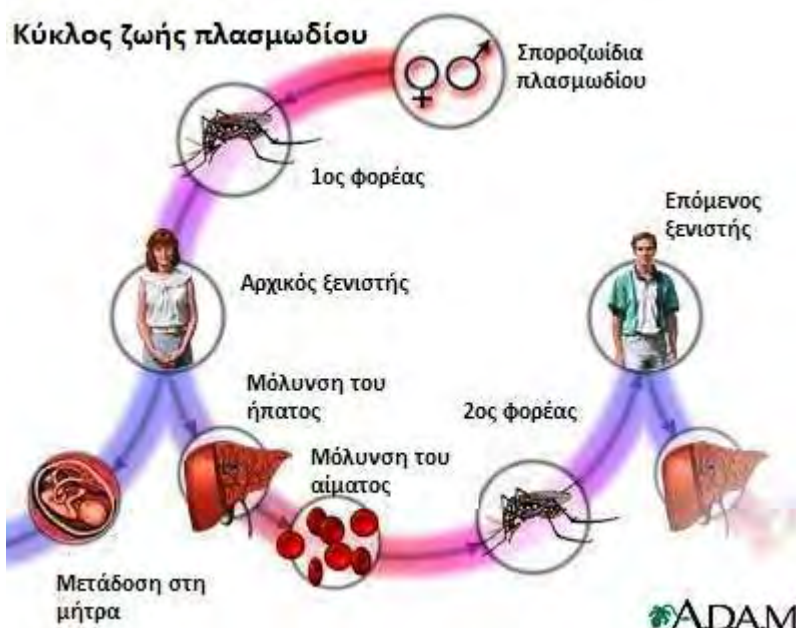


Εικόνα 10: Απεικόνιση ανάπτυξης καρδιακής νόσου και αθηροσκλήρυνσης σε ApoE knock out ποντίκια⁽¹⁶⁾



1.4 Υδροξυχλωροκίνη

Η υδροξυχλωροκίνη (Εικόνα 11) είναι ένα ανθελμονοσιακό φάρμακο, που χρησιμοποιείται επίσης και για τη θεραπεία ορισμένων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως είναι η ρευματοειδής



αυτοχλωροκίνη
αρθρίτιδα, ο
συστηματικός
ερυθηματώδης λύκος
(ΣΕΛ) και το σύνδρομο
Sjogren.

Η ελονοσία
είναι μια λοιμώδης
ασθένεια που
προκαλείται από
παρασιτικά πρωτόζωα
του γένους πλασμώδιο

Εικόνα 12: Ο κύκλος ζωής του πλασμωδίου⁽⁴⁸⁾

(*Plasmodium*) και η οποία μεταδίδεται στον άνθρωπο μόνο από το θηλυκό κουνούπι του γένους Ανωφελές (*Anopheles*) (Εικόνα 12). Διεθνώς αποκαλείται μαλάρια. Σήμερα είναι γνωστό ότι τα πλασμώδια που μπορούν να προκαλέσουν ελονοσία στον άνθρωπο είναι τα πλασμώδια των ειδών *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* και, σε μικρότερη έκταση *P. knowlesi*. Το είδος *P. falciparum* είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο από όλα τα άλλα είδη πλασμωδίων, προκαλεί τις περισσότερες λοιμώξεις, παρουσιάζει αντίσταση στα συνήθη ανθελνοσιακά φάρμακα και είναι και το πιο επικίνδυνο, καθώς αποτελεί την αιτία της πλειονότητας των θανάτων από μαλάρια. Η διάγνωση γίνεται όταν αναγνωρισθεί το πλασμώδιο στο αίμα του ασθενούς σε εξέταση με μικροσκόπιο. Η θεραπεία της νόσου βασίζεται σε φάρμακα που παρεμβαίνουν στο κύκλο ζωής ή στο μεταβολισμό του παράσιτου.

Η υδροξυχλωροκίνη μπορεί να αποτρέψει τη διάσπαση της αιμοσφαιρίνης στα ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια από τα παράσιτα της ελονοσίας. Η υδροξυχλωροκίνη είναι αποτελεσματική κατά των παρασίτων της ελονοσίας *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, και των ευαίσθητων στελεχών του *P. falciparum*.

Η υδροξυχλωροκίνη, εκτός από την κατηγορία των ανθελνοσιακών φαρμάκων, κατατάσσεται και στην κατηγορία των παραγόντων που επηρεάζουν την εξέλιξη ορισμένων ρευματικών παθήσεων (DMARDs)⁽¹⁷⁾. Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα μπορεί να ελαττώσει τη φλεγμονή και έτσι να ελαττώσει τον πόνο, το οίδημα και τη δυσκαμψία των αρθρώσεων ενώ στον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των δερματικών εξανθημάτων. Ο τρόπος δράσης της υδροξυχλωροκίνης στη θεραπεία των αυτοάνοσων διαταραχών δεν είναι πλήρως γνωστός. Πιθανολογείται ότι το φάρμακο συνδέεται με το δεοξυριβοζοπυρηνικό οξύ (DNA) και παρεμποδίζει τον πολυμερισμό του, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ανοσοκατασταλτικής δράσης καθώς και επίδρασης σε διάφορες θειο-ομάδες (θειοϋδρυλικό δισουλφίδιο). Το φάρμακο έχει αποδειχθεί ότι σταθεροποιεί επίσης τη μεμβράνη των λυσοσωμάτων και έτσι μειώνεται η απελευθέρωση των κινινών (ισταμίνη, σεροτονίνη)⁽¹⁷⁾. Η μαζική άθροιση της υδροξυχλωροκίνης στο σύστημα του κυστιδίου, ιδίως στα λυσοσώματα των λεμφοκυττάρων, των πολυμορφοπυρήνων και των μακροφάγων, μπορεί να ευθύνεται για την αντιρρευματική και ανοσοκατασταλτική δράση των ανθελνοσιακών.

Ωστόσο, η κυριότερη δράση του ανθελνοσιακού αυτού φαρμάκου, φαίνεται ότι είναι η παρέμβασή τους στην κυτταρική λειτουργία σε περιοχές όπου υπάρχει όξινο περιβάλλον, όπως στα λυσοσώματα, στα ενδοσώματα και στο σύμπλεγμα του Golgi. Η βασική αυτή δράση μπορεί να παρεμβαίνει σε οδούς της φλεγμονής, στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ενζυμική δραστηριότητα (λυσοσωματοτροπική δράση). Η λυσοσωματοτροπική δράση οφείλεται στο γεγονός ότι τα ανθελνοσιακά φάρμακα είναι ασθενείς βάσεις οι οποίες διεισδύουν στα λυσοσώματα, πρωτονιώνονται, αυξάνουν το pH και παρεμβαίνουν στην ενζυμική δραστηριότητα που εξαρτάται από το όξινο περιβάλλον.

Η δοσολογία της υδροξυχλωροκίνης ποικίλλει ανάλογα με την ασθένεια για την οποία χορηγείται και τα συμπτώματα του ασθενούς. Η συνήθης δόση για ενήλικες για τη θεραπεία της ελονοσίας είναι 800 mg αρχικά, ακολουθούμενη από 400 mg 6 ώρες αργότερα και 400 mg κατά τη δεύτερη και τρίτη μέρα⁽¹⁸⁾. Η συνιστώμενη δόση για ενήλικες

που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα είναι 400 – 600 mg ημερησίως για 4 – 12 εβδομάδες ακολουθούμενη από 200 – 400 mg ημερησίως. Εάν ο στόχος της βελτίωσης (όπως μείωση του οιδήματος και αύξηση της κινητικότητας της άρθρωσης) δεν επιτευχθεί εντός έξι μηνών, το φάρμακο πρέπει να διακοπεί. Τέλος, η αρχική δόση που χορηγείται σε ασθενείς που πάσχουν από συστηματικό ερυθματώδη λύκο είναι 400 – 600 mg ημερησίως ακολουθούμενη από 200 mg ημερησίως. Αυτή η δοσολογία μπορεί να συνεχιστεί για αρκετές εβδομάδες ή μήνες, ανάλογα με την ανταπόκριση του ασθενούς⁽¹⁸⁾.

Η υδροξυχλωροκίνη είναι συνήθως πολύ καλά ανεκτή, και σοβαρές παρενέργειες είναι σπάνιες. Οι πιο συχνά παρατηρούμενες ανεπιθύμητες παρενέργειες είναι η ναυτία και η διάρροια, τα οποία συνήθως βελτιώνονται με το χρόνο ή με τη λήψη του φαρμάκου με την τροφή. Λιγότερο συχνές ανεπιθύμητες παρενέργειες περιλαμβάνουν δερματικά εξανθήματα, αλλαγές στη χροιά του δέρματος ή των μαλλιών και αδυναμία. Σπάνια, η υδροξυχλωροκίνη μπορεί να οδηγήσει σε αναιμία ή μπορεί να προκαλέσει σοβαρή μυελοτοξικότητα. Επίσης σπάνια μπορεί να προκαλέσει αμφιβληστροειδοπάθεια σε υψηλές δόσεις και μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της όρασης χωρίς εμφάνιση συμπτωμάτων. Ως εκ τούτου, εφόσον χορηγείται σε υψηλές δόσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα, συνιστώνται τακτικές οφθαλμολογικές εξετάσεις, ακόμη και όταν δεν υπάρχουν συμπτώματα.

1.5 Υδροξυχλωροκίνη και Αθηροσκλήρυνση

Ένα χαρακτηριστικό των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα (ρευματοειδής αρθρίτιδα, ΣΕΛ), είναι η ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης συχνότερα και σε μικρότερη ηλικία σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. Η αυξημένη καρδιαγγειακή θνητότητα που οφείλεται σε πρόωμη αθηροσκλήρυνση δεν μπορεί να εξηγηθεί πλήρως από τους κλασικούς (κοινούς) παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα, δυσλιπιδαιμία, διαβήτης, υπέρταση, παχυσαρκία) υποδηλώνοντας ότι άλλοι παράγοντες κινδύνου (μη κοινοί) ενέχονται στους ασθενείς με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα (Εικόνα 13). Συνήθως, η ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης είναι συνέπεια της χρόνιας συστηματικής φλεγμονής και της θεραπείας με στεροειδή φάρμακα, τα οποία θεωρείται ότι είναι αθηρογόνα λόγω της επίδρασής τους στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος⁽¹⁹⁾.

Κοινοί και <<μη κοινοί>> παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα

Κοινοί παράγοντες κινδύνου	<<Μη κοινοί>> παράγοντες κινδύνου στα αυτοάνοσα νοσήματα
Φύλο	Αυτοαντισώματα ενάντια των φωσφολιπιδίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων
Ηλικία	ds - DNA ή ANCA
Δυσλιπιδαιμία	Συστημική φλεγμονή
Κάπνισμα	Ενισχυμένη οξειδωση λιπιδίων
Υπέρταση	Αγγειακή αναδιαμόρφωση
Διαβήτης	Επίπεδα heat shock proteins και αυτοαντισώματα έναντι αυτών
Παχυσαρκία	Νεφρική ανεπάρκεια
Οικογενειακό ιστορικό καρδιαγγειακών νοσημάτων	Αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης
	Φαρμακευτική αγωγή κυρίως με στεροειδή
	Εξάντληση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων

Εικόνα 13: Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα ⁽¹⁹⁾

Όπως προαναφέρθηκε, στους ασθενείς που πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα, εκτός από στεροειδή φάρμακα, χορηγούνται και φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των ανθελανοσοιακών, όπως είναι η υδροξυχλωροκίνη. Στους ασθενείς αυτούς παρατηρήθηκε ότι η υδροξυχλωροκίνη μπορεί να μειώσει τη LDL χοληστερόλη καθώς και την παραγωγή τριγλυκεριδίων με συνέπεια την μειωμένη ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης ⁽²⁰⁾. Επιπλέον, η Canadian HCQ study group (ομάδα μελέτης της υδροξυχλωροκίνης του Καναδά) αναφέρει ότι η υδροξυχλωροκίνη βελτίωσε τα επίπεδα των λιπιδίων και της γλυκόζης του αίματος με συνέπεια μια πιθανή αντιθρομβωτική δράση ενώ επίσης σχετίζεται με μείωση του ποσοστού της αθηρωματικής πλάκας στις αρτηρίες.

Τέλος, σε πειραματική μελέτη κατεδείχθη ότι η υδροξυχλωροκίνη μπορεί να αναστρέψει τη αυξημένη θρομβογένεση που παρατηρείται σε ποντίκια μέσω αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων ⁽²¹⁾. Στο πείραμα αυτό, οι ερευνητές βασίστηκαν σε προηγούμενες μελέτες οι οποίες είχαν δείξει ότι ανθρώπινα μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα καρδιολιπίνης έχουν θρομβογόνες ιδιότητες in vivo. Έτσι, χρησιμοποίησαν ποντίκια που παρουσίαζαν τα χαρακτηριστικά αυτά και τους χορήγησαν υδροξυχλωροκίνη με σκοπό να μελετήσουν την επίδραση του φαρμάκου στην ανάπτυξη θρομβώσεων. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρεις ομάδες των εννέα ποντικίων και με ένεση τους χορηγήθηκε ανοσοσφαιρίνη G (IgG) από ασθενή με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (IgG-APS) και στη συνέχεια τους χορηγήθηκε υδροξυχλωροκίνη σε διάφορες δόσεις (100, 6, και 3 mg / kg) και έγινε σύγκριση με τρεις ομάδες ποντικίων στα οποία χορηγήθηκε εικονικό (placebo) φάρμακο ⁽²¹⁾. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση υδροξυχλωροκίνης μείωσε την ανάπτυξη θρομβώσεων συγκριτικά με τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε το εικονικό φάρμακο. Επίσης, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτή η δράση της υδροξυχλωροκίνης ήταν πιθανώς δόσοεξαρτώμενη ⁽²¹⁾.

Κλινικές αναδρομικές μελέτες για τη χρήση υδροξυχλωροκίνης στην πρόληψη της θρόμβωσης σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) πραγματοποιούνται από το 1987 (Εικόνα 14) ⁽¹⁷⁾. Αρκετές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η υδροξυχλωροκίνη σε ασθενείς με ΣΕΛ μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης θρόμβωσης. Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα ^{(22) (23)}.

Απόδειξη ότι η υδροξυχλωροκίνη αποτρέπει τη θρόμβωση σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ)

Μελέτη	Τύπος μελέτης	Θρόμβωση	Αποτελέσματα
Wallace (1987)	Αναδρομική (N=92)	Αρτηριακή + φλεβική	$P < 0.05$
Petri et al. (1994)	Προοπτική (N=393)	Αρτηριακή	OR, 0.36
Ruiz-Irastorza et al (2006)	Προοπτική (N=232)	Αρτηριακή + φλεβική	HR, 0.28
Tektonidou et al. (2009)	Ασθενείς - μάρτυρες (ασθενείς=144, μάρτυρες=144)	Αρτηριακή + φλεβική	HR, 0.99
Jung et al. (2010)	Ασθενείς - μάρτυρες (ασθενείς=54, μάρτυρες=108)	Αρτηριακή + φλεβική	OR, 0.32

HR λόγος κινδύνου, OR λόγος πιθανότητας

Εικόνα 14: Κλινικές μελέτες για τη χρήση της υδροξυχλωροκίνης και την πρόληψη της θρόμβωσης σε ασθενείς με ΣΕΛ ⁽¹⁷⁾

1.6 Επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1: HIF – 1

Η πλειοψηφία των οργανισμών απαιτούν οξυγόνο ώστε να επιβιώσουν. Από αυτούς, οι πολυκύτταροι οργανισμοί, όπως είναι ο άνθρωπος, διαθέτουν εξειδικευμένα όργανα για την πρόσληψη, την μεταφορά και την κατανομή του οξυγόνου στους διάφορους ιστούς. Ο κύριος παράγοντας για την απόδοση του οξυγόνου στους ιστούς είναι η μερική πίεση οξυγόνου (P_{IO₂})⁽²⁴⁾. Η μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου στους ιστούς κάτω από τα φυσιολογικά επίπεδα, είναι γνωστή ως υποξία. Η υποξία, η οποία συχνά εμφανίζεται σε υψηλό υψόμετρο, κατά τη διάρκεια επούλωσης τραυμάτων, σε χρόνιες ή οξείες αγγειακές παθήσεις και στον καρκίνο, έχει σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργία των κυττάρων και θέτει σε κίνδυνο την επιβίωσή τους. Το καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα παίζουν κεντρικό ρόλο στην ομοιοστασία του οξυγόνου και ενεργοποιούν διάφορους ομοιοστατικούς μηχανισμούς σε περίπτωση υποξίας. Όταν η υποξία διαρκεί περισσότερο χρόνο εκτός από τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς, παρατηρούνται και αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης πολλών γονιδίων⁽²⁵⁾.

Παρόλα αυτά, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας ενάντια στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου⁽²⁵⁾. Ανάμεσα σε αυτές, είναι η αύξηση του ρυθμού της αναπνοής και της κατανομής του οξυγόνου στους διάφορους ιστούς, η προαγωγή της διαδικασίας της ερυθροποίησης, ο σχηματισμός νέων αγγείων (νεοαγγειογένεση), η ενεργοποίηση της γλυκολυτικής οδού καθώς και η αλλαγή στην έκφραση ορισμένων γονιδίων, όπως είναι τα γονίδια που συμμετέχουν στη μεταφορά του οξυγόνου, στο μεταβολισμό του σιδήρου, στη νεοαγγειογένεση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών δρουν αντιρροπιστικά και μειώνουν τις επιπτώσεις της υποξίας, συμβάλλοντας ταυτόχρονα στην ενεργοποίηση των παραπάνω διαδικασιών. Πολλές από τις διεργασίες που εμπλέκονται στην ομοιοστασία του οξυγόνου, ρυθμίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες επαγόμενους από την υποξία (HIFs). Ο πιο σημαντικός από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες είναι ο <<επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας – 1>>, HIF – 1⁽²⁴⁾.

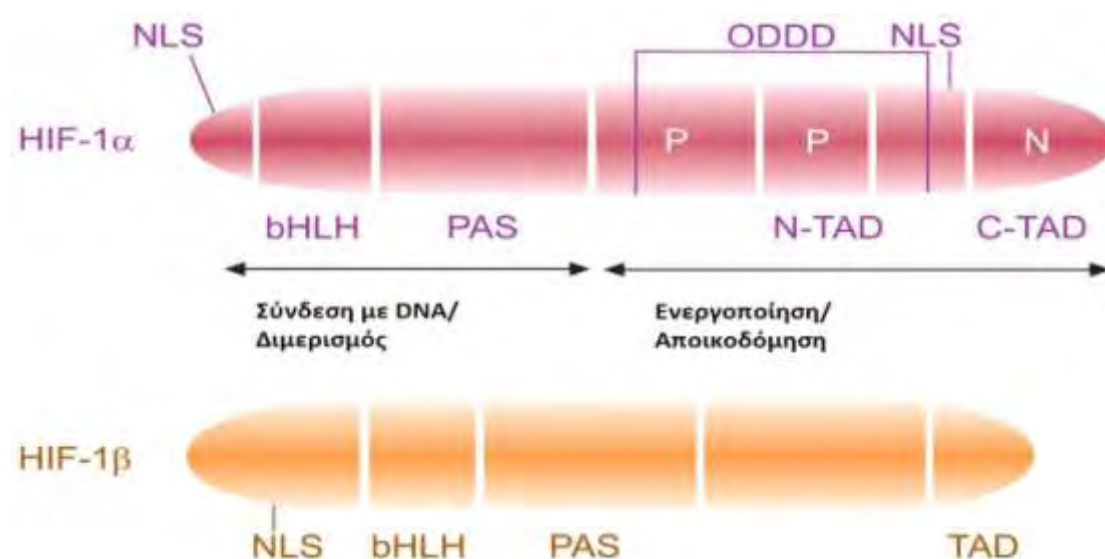
Ο HIF – 1 αποτελεί το ρυθμιστικό μόριο της έκφρασης των γονιδίων που εξαρτώνται από τα επίπεδα του οξυγόνου. Τα γονίδια – στόχοι του HIF – 1 περιλαμβάνουν κυρίως γονίδια που συμμετέχουν στους μηχανισμούς ομοιοστασίας του οξυγόνου και κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες⁽²⁴⁾.

1. Γονίδια που επάγουν την ερυθροποίηση (π.χ. ερυθροποιητίνη) και γονίδια που εμπλέκονται στη μεταφορά του σιδήρου
2. Γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τη λειτουργικότητα του αγγειακού συστήματος (π.χ. VEGF)
3. Γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό της αναερόβιας γλυκόλυσης
4. Γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς και γονίδια απόκρισης σε ακραία ερεθίσματα (stress)

Ο HIF – 1 είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από δύο υπομονάδες, τον HIF – 1α και τον HIF – 1β (ARNT). Το γονίδιο του HIF – 1α έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 14, ενώ το γονίδιο του HIF – 1β, στο χρωμόσωμα 21. Έχει βρεθεί, ότι σε επίπεδο mRNA, και οι δύο υπομονάδες

του HIF – 1 εκφράζονται συνεχώς. Ωστόσο, σε επίπεδο πρωτεΐνης μόνο ο HIF – 1α εκφράζεται σε υποξικά κύτταρα, σε αντίθεση με τον HIF – 1β που εκφράζεται συνεχώς⁽²⁶⁾.

Η κάθε υπομονάδα του HIF – 1 περιλαμβάνει δύο δομές: τη δομή bHLH (δομή έλικα – θηλιά – έλικα) και τη δομή PAS (Εικόνα 15)⁽²⁷⁾. Η δομή PAS είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του HIF – 1 με άλλες πρωτεΐνες, ενώ η δομή bHLH είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA και για το διμερισμό με την HIF – 1α υπομονάδα. Για την ενεργοποίηση του HIF – 1 απαιτείται ο διμερισμός της HIF – 1α υπομονάδας με τη HIF – 1β. Η ενεργοποίηση του HIF – 1 επιτρέπει τη σύνδεση του παράγοντα στη HRE (hypoxia response element) περιοχή του υποκινητή του γονιδίου – στόχου.



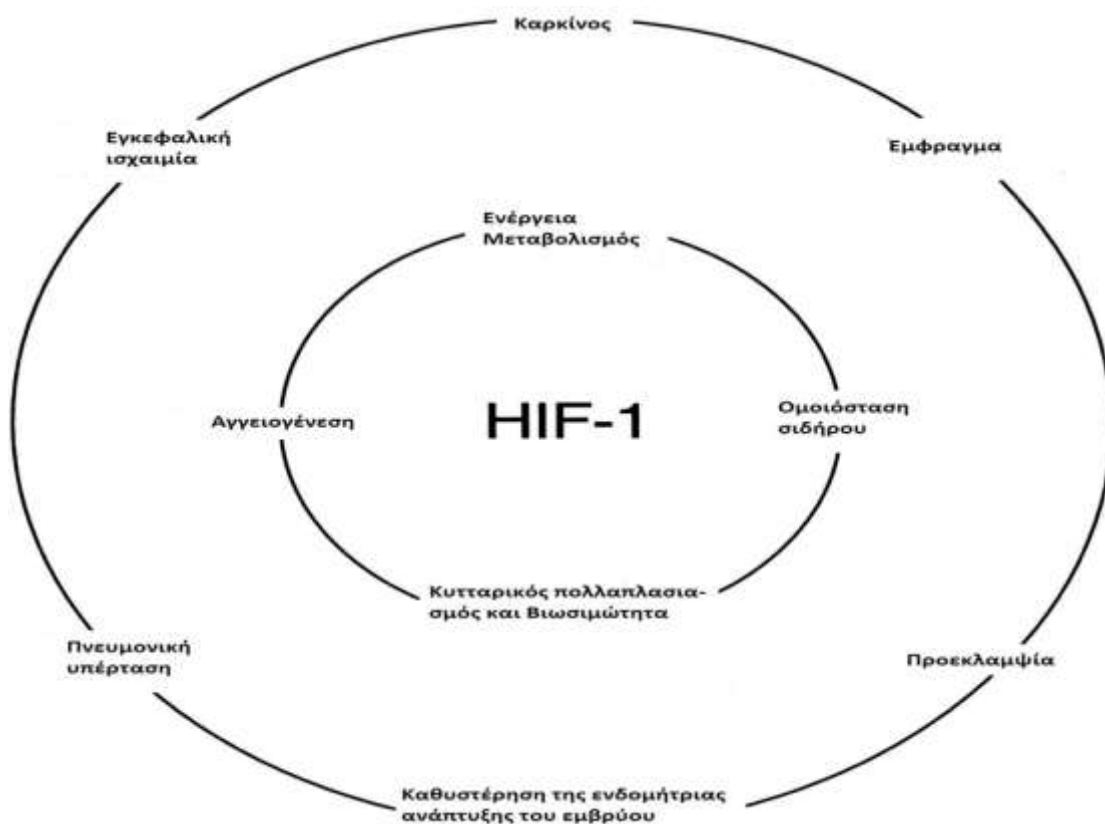
Εικόνα 15: Δομή των δύο υπομονάδων του HIF - 1⁽²⁸⁾

1.7 HIF – 1α

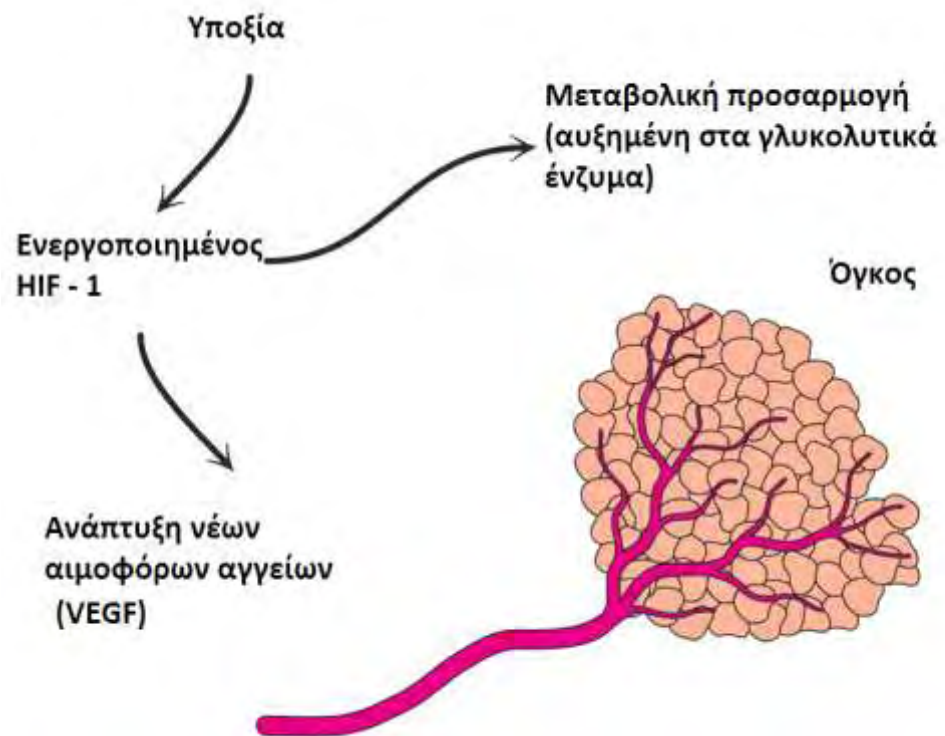
Ο HIF – 1α είναι μια πρωτεΐνη, μεγέθους 120 kD και αποτελείται από 826 αμινοξέα. Ο HIF – 1α εκτός από τις περιοχές NLS, bHLH και PAS που περιέχει και ο HIF1 – β, περιέχει και κάποιες μοναδικές περιοχές, τις TAD και τις ODDD(Εικόνα 15). Οι TAD περιοχές (trans – activation domain) είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων – στόχων του HIF – 1. Επιπλέον, σε αυτές τις περιοχές μπορούν να προσδένονται και συνενεργοποιητές που είναι απαραίτητοι για την ομαλή ενεργοποίηση του HIF – 1. Η περιοχή ODDD (oxygen dependent degradation domain) εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF – 1α και είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της έκφρασης του HIF – 1α και την αποδόμησή του σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου⁽²⁸⁾.

Ο παράγοντας HIF – 1, και συνηθέστερα η υπομονάδα HIF – 1α, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες (Εικόνα 16). Έτσι, έχει βρεθεί ότι ο HIF – 1α ενεργοποιεί την έκφραση της ενδοθηλίνης – 1 (ισχυρού αγγειοσυσπαστικού παράγοντα) στα αγγειακά κύτταρα, ενώ η αγγειοτενσίνη II επάγει την έκφραση του HIF – 1 στα λεία μυϊκά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας. Επίσης, λόγω του μεγάλου εύρους των γονιδίων στόχων του HIF – 1, φαίνεται ότι ο μεταγραφικός αυτός

παράγοντας εμπλέκεται και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η ανάπτυξη ισχαιμικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων και πνευμονικής υπέρτασης, η εμφάνιση διαταραχών κατά τη κύηση και η ανάπτυξη καρκίνου ⁽²⁹⁾. Πιο συγκεκριμένα, ο HIF – 1α έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε ορισμένους κοινούς τύπους καρκίνου, όπως είναι ο καρκίνος του πνεύμονα και μάλιστα η υπερέκφρασή του αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη για την εξέλιξη του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου ⁽³⁰⁾. Αυτή η υπερέκφραση του HIF – 1α οδηγεί στην υπερέκφραση και άλλων πρωτεϊνών, όπως είναι ο VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας) ο οποίος έχει ενεργό ρόλο στην νεοαγγειογένεση και την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων ⁽³¹⁾. Έτσι, ο νεοπλασματικός ιστός τροφοδοτείται με νέα αγγεία, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωση και εξάπλωση του(Εικόνα 17) ⁽³²⁾.

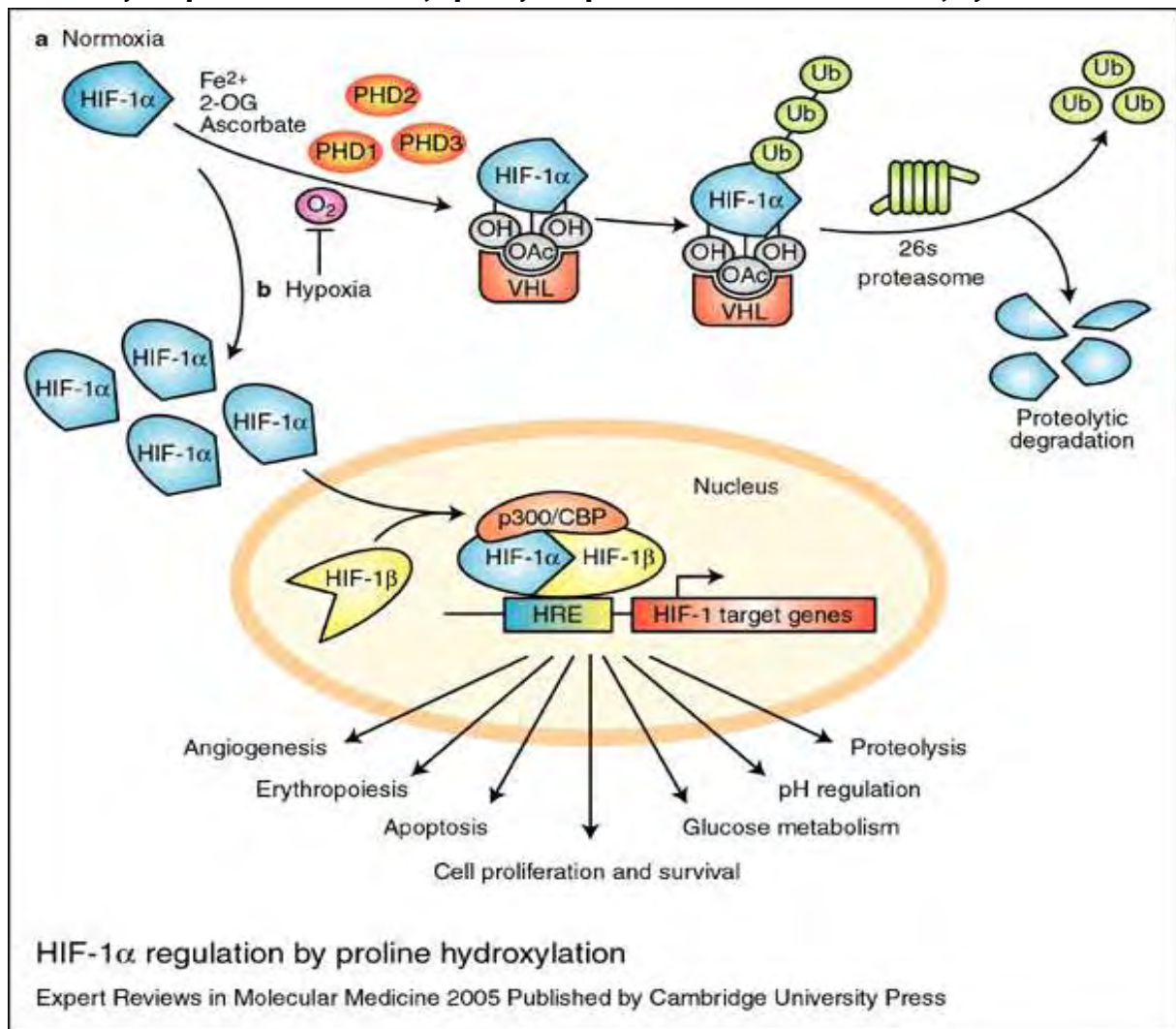


Εικόνα 16: Φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχει ο HIF - 1 ⁽²⁹⁾



Εικόνα 17: Μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση σε όγκους που οφείλονται στην υποξία ⁽³²⁾

1.8 Ρύθμιση του HIF - 1α εξαρτώμενη από τα επίπεδα του οξυγόνου



Εικόνα 18: Ρύθμιση του HIF - 1α εξαρτώμενη από τα επίπεδα του οξυγόνου⁽³³⁾

Κατά την νορμοξία (φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου στους ιστούς), ο HIF - 1α αρχικά υδροξυλιώνεται στην ODDD περιοχή από μία οικογένεια οξυγόνο - εξαρτώμενων προλυλ - υδροξυλασών (PHDs), οι οποίες είναι διοξυγενάσες που περιέχουν αίμη και ως υποστρώματά τους χρησιμοποιούν τόσο το οξυγόνο όσο και το 2 - κετογλουταρικό. Η υδροξυλίωση αυτή είναι απαραίτητη καθώς ρυθμίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF - 1α και της πρωτεΐνης VHL (von Hippel - Lindau). Η πρωτεΐνη VHL είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που συνδέεται με τον υδροξυλιωμένο HIF - 1α και δρα ως υπόστρωμα, το οποίο αναγνωρίζεται από την λιγάση E3 της ουβικουιτίνης. Η σύνδεση της λιγάσης με τον HIF - 1α έχει ως αποτέλεσμα τη προσέλκυση και άλλων πρωτεϊνών που ανήκουν στο μηχανισμό της ουβικουιτινίωσης - πρωτεοσώματος, με αποτέλεσμα ο HIF - 1α να οδηγείται στο πρωτεόσωμα 26S, όπου και αποδομείται (Εικόνα 18)⁽³³⁾.

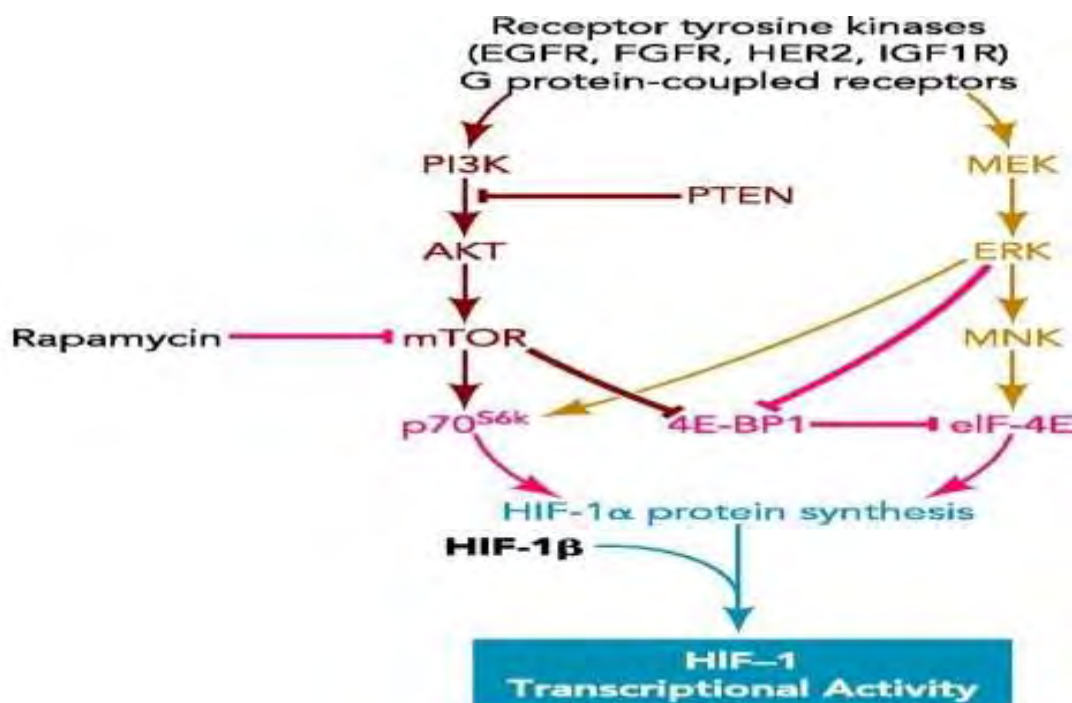
Σε συνθήκες υποξίας, οι PHDs καθίστανται ανενεργές αφού δεν υπάρχει οξυγόνο για να χρησιμοποιήσουν ως υπόστρωμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η υδροξυλίωση του HIF - 1α και η πρόσδεση της VHL, συνεπώς ο HIF - 1α σταθεροποιείται. Στη συνέχεια, ο HIF - 1α μεταφέρεται στον πυρήνα όπου και συνδέεται με τον HIF - 1β, σχηματίζοντας έτσι την ετεροδιμερή πρωτεΐνη HIF - 1. Ο HIF - 1 πλέον έχει την ικανότητα

να συνδεθεί με το HRE του υποκινητή του γονιδίου – στόχου και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή του ⁽³⁴⁾.

1.9 Ρύθμιση του HIF – 1α ανεξάρτητα από τα επίπεδα του οξυγόνου

Αν και το μονοπάτι των PHDS – VHL φαίνεται να είναι ο κύριος μηχανισμός ρύθμισης του HIF – 1α στις αλλαγές της συγκέντρωσης του οξυγόνου, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι μία ακόμα πρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του HIF – 1α. Η RACK1 είναι μια πρωτεΐνη, της οποίας ο ρόλος αρχικά αναγνωρίστηκε ως βοηθητικός στην αλληλεπίδραση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) με τα υποστρώματά της. Η πρωτεΐνη αυτή μπορεί και προσδένεται στον HIF – 1α, ανεξάρτητα από τα επίπεδα του οξυγόνου, με αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση με μία άλλη πρωτεΐνη, την Elongin C. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως συνέπεια την προσέλκυση της λιγάσης E3 και τελικά την αποικοδόμηση του HIF – 1α από το πρωτεόσωμα 26S ⁽³⁴⁾.

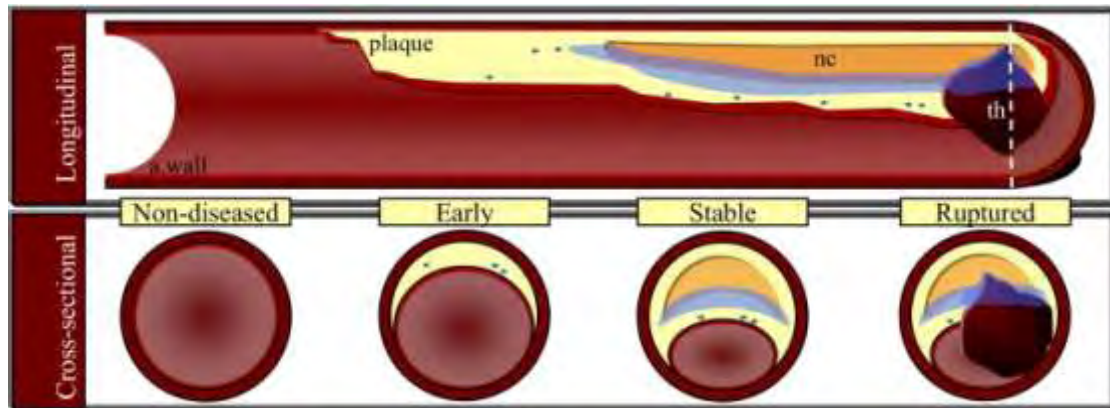
Η έκφραση του HIF – 1α, εκτός από τους παραπάνω μηχανισμούς, ρυθμίζεται και από σηματοδοτικές οδούς ανεξάρτητες των επιπέδων οξυγόνου. Οι οδοί αυτές είναι η οδός της κινάσης της 3 – φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K) και η οδός της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνες ουσίες (MAPK). Οι δύο αυτές οδοί ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και ογκογονίδια. Η ενεργοποίηση της οδού της PI3K οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της σύνθεσης του HIF – 1α ενώ η ενεργοποίηση της οδού των MAP κινάσεων οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF – 1α (Εικόνα 19) ⁽³⁴⁾.



Εικόνα 19: Ανεξάρτητα από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF - 1α ⁽³⁴⁾

1.10 Αθηροσκλήρυνση και HIF – 1α

Όπως είναι γνωστό, τα αφρώδη κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία της αθηροσκλήρυνσης, προέρχονται από τη φαγοκυττάρωση της οξειδωμένης LDL από τα μακροφάγα ⁽¹⁾. Τα μακροφάγα έχουν την τάση να εντοπίζονται και να παραμένουν σε υποξικές περιοχές των αθηροσκληρυντικών πλακών. Κατά την ανάπτυξη της αθηροσκληρυντικής βλάβης, η υποξία επιδεινώνεται τόσο από τη συνεχόμενη πάχυνση του αρτηριακού τοιχώματος, όσο και από τη συνεχόμενη ζήτηση οξυγόνου από τα μακροφάγα (Εικόνα 20) ⁽³⁵⁾.



Εικόνα 20: Παρουσία υποξίας στα διάφορα στάδια της αθηροσκλήρυνσης (μπλε χρώμα) ⁽³⁶⁾

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τα λεμφοκύτταρα αποτελούν ένα σημαντικό καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της αθηροσκληρυντικής βλάβης ⁽⁴⁾. Στις αθηροσκληρυντικές βλάβες εντοπίζονται κυρίως τα Th₁ (τύπου 1 βοηθητικά T – λεμφοκύτταρα), τα οποία εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως είναι η ιντερφερόνη – γ (IFN – γ), η ιντερλευκίνη – 2 (IL – 2) και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων – α (TNF – α) και μπορούν έτσι να διεγείρουν τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προάγοντας την εξέλιξη της φλεγμονής ⁽⁴⁾. Πρόσφατα πειράματα αποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση του HIF – 1α προκαλεί προαγωγή της φλεγμονώδους απάντησης με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών μέσω του TCR (κυτταρικός υποδοχέας των T – λεμφοκυττάρων), ενώ παράλληλα μειώνοντας τη σηματοδότηση επηρεάζει τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Συνολικά, αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο HIF – 1α ευοδώνει τη διάδοση της κυτταρικής απάντησης μέσω των Th₂ λεμφοκυττάρων (τύπου 2 βοηθητικά T – λεμφοκύτταρα) ενώ μειώνει την κυτταρική απάντηση μέσω των Th₁ λεμφοκυττάρων. Γι' αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ApoE knockout ποντίκια, στα οποία χορηγήθηκε πλασμίδιο, που έφερε το ανθρώπινο γονίδιο του HIF – 1α, σε κύτταρα του σπλήνα. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε ο σπλήνας και η αορτή των ποντικών αυτών και μετρήθηκε τόσο η έκφραση του HIF – 1α και η έκφραση της IFN – γ, όσο και το μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας. Τα αποτελέσματα έδειξαν υπερέκφραση του HIF – 1α, μείωση της έκφρασης της IFN – γ και σημαντική μείωση του μεγέθους της αθηροσκληρυντικής πλάκας, οπότε οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η υπερέκφραση του HIF – 1α σε λεμφοκύτταρα των ApoE knockout ποντικών μπορεί να οδηγήσει στη μείωση του μεγέθους της αθηροσκληρυντικής βλάβης ⁽³⁷⁾.

Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι στις αθηροσκληρυντικές πλάκες αναπτύσσονται νέα αγγεία, με τη διαδικασία της νεοαγγειογένεσης, η οποία σχετίζεται με την πρόοδο ανάπτυξης της πλάκας. Η νεοαγγειογένεση είναι μια σημαντική συνέπεια της υποξίας σε διάφορους ιστούς, οπότε η δημιουργία νέων αγγείων σε αθηροσκληρυντικές πλάκες, υποδηλώνει την ύπαρξη υποξίας. Ένα υποξικό κύτταρο, κατά κανόνα ενεργοποιεί τον HIF – 1α. Τα παραπάνω συμπεράσματα έχουν αποδειχθεί σε πειραματικά ζωικά μοντέλα ενώ στον άνθρωπο δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν παρατηρείται ενεργοποίηση του HIF – 1α, λόγω των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων διαφόρων πειραμάτων⁽³⁶⁾.

Τέλος, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα καρδιάς ασθενών μελετήθηκε με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας η έκφραση του HIF – 1α ώστε να προσδιοριστεί η συσχέτιση του παράγοντα αυτού με την ισχαιμία του μυοκαρδίου, η οποία μπορεί να οδηγεί σε έμφραγμα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η έκφραση του HIF – 1α δεν είναι σημαντική στα φυσιολογικά καρδιακά κύτταρα ενώ η έκφρασή του αυξάνεται σημαντικά μέσα σε 2 ώρες μετά από την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου. Έτσι, ο HIF – 1α θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης του εμφράγματος του μυοκαρδίου και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ασυμπτωματικών ασθενών⁽³⁸⁾.

1.11 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Σε προηγούμενες πειραματικές μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι τα ApoE knockout ποντίκια εμφανίζουν αυξημένη έκφραση του HIF – 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες⁽³⁹⁾.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η έκφραση του HIF – 1α σε αθηροσκληρυντικές πλάκες ApoE knockout ποντικών, στα οποία είχε προηγηθεί αγωγή με υδροξυχλωροκίνη για 16 εβδομάδες και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με ανοσοϊστοχημική μέθοδο.

Επιπλέον, η έκφραση του HIF – 1α συσχετίστηκε με το μέγεθος των αθηροσκληρυντικών πλακών και έγινε σύγκριση με την έκφραση της eNOS (ενδοθηλιακή συνθετάση του νιτρικού οξειδίου) στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των ApoE knockout ποντικών με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης⁽⁴⁰⁾.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υδροξυχλωροκίνη

Η υδροξυχλωροκίνη αγοράστηκε από την εταιρεία Sanofi – Aventis Co.

2.2 Θεραπευτική αγωγή

Η υδροξυχλωροκίνη χορηγήθηκε στα ποντίκια, σε δόση 100 mg/kg στο πόσιμο νερό. Η ποσότητα της δοσολογίας καθορίστηκε λαμβάνοντας υπόψιν το γρήγορο μεταβολισμό του φαρμάκου στα ποντίκια αλλά και προηγούμενες μελέτες χορήγησης υδροξυχλωροκίνης σε ποντίκια ⁽²¹⁾. Τα διαλύματα που χορηγήθηκαν προετοιμάστηκαν σε διάστημα 2 – 3 ημερών και καθορίστηκαν με βάση το μέσο όγκο νερού που καταναλώνεται ανά ημέρα από τα ποντίκια (3 mL) καθώς και στο σωματικό βάρος που αυξάνεται σταδιακά από περίπου 24 g σε 30 g ανά ποντίκι, καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας, που διήρκεσε 16 εβδομάδες.

2.3 Ζώα

Εβδομήντα (70) ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη, τα οποία χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες ως εξής: σαράντα οκτώ (48) ζώα (24 αρσενικά και 24 θηλυκά) στα οποία χορηγήθηκε υδροξυχλωροκίνη 100 mg/kg και είκοσι δύο (22) ζώα (10 αρσενικά και 12 θηλυκά), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (controls). Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρήση των ζώων που έχουν εγκριθεί από την Επιτροπή για τη ζωική φροντίδα, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Όλα τα ποντίκια αγοράστηκαν από το Jackson Laboratory, USA και χαρακτηρίζονται ως C57BL/6J – AroE. Τα ποντίκια αυτά, αρσενικά και θηλυκά, ήταν ομοζυγωτικά για την έλλειψη του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E, και είχαν διασταυρωθεί για 10 γενεές. Τα ποντίκια παρελήφθησαν σε ηλικία 8 εβδομάδων και ελάμβαναν τροφή που περιείχε 5% λίπος ενώ είχαν συνεχή και ελεύθερη πρόσβαση σε φαγητό και νερό καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Μετά από 8 εβδομάδες εγκλιματισμού ξεκίνησε η χορήγηση υδροξυχλωροκίνης, δηλαδή σε ηλικία 16 εβδομάδων. Η θεραπεία διήρκεσε 16 εβδομάδες. Σε ηλικία 32 εβδομάδων και κάτω από γενική αναισθησία με φαινοβαρβιτάλη, πραγματοποιήθηκε κοιλιακή τομή και ελήφθη δείγμα αίματος από την κάτω κοίλη φλέβα με σκοπό τον προσδιορισμό των λιπιδίων του πλάσματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθετηριασμός της αριστερής κοιλίας της καρδιάς και πραγματοποιήθηκε έγχυση PBS και διαλύματος φορμαλδεΰδης 4%, με σκοπό την έκπλυση του αίματος από το αγγειακό δίκτυο των πειραματόζων. Τέλος, τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε ευθανασία με χορήγηση υπερβολικής δόσης φαινοβαρβιτάλης. Ακολούθως, η καρδιά και η αορτή αφαιρούντο.

2.4 Δημιουργία τομών

Η καρδιά και η αορτή που αφαιρέθηκαν, ζυγίστηκαν και διατηρήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Στη συνέχεια, η καρδιά και η αορτή τεμαχίστηκαν με νυστέρι όπως περιγράφεται από τους Paigen et al ⁽⁴¹⁾. Ο ιστός υποβλήθηκε σε επεξεργασία και ενσωματώθηκε σε παραφίνη με συμβατικές μεθόδους. Κατόπιν έγιναν τομές σε μέγεθος 3 μm με τη χρήση του μικροτόμου Leica TP1020 και βάφτηκαν με χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Οι τομές που πάρθηκαν από την περιοχή της εγγύς ανιούσας αορτής χρησιμοποιήθηκαν για μορφομετρική ανάλυση όπως περιγράφεται από τους Paigen et al ⁽⁴¹⁾.

2.5 HIF – 1α ανοσοϊστοχημία

Οι τομές των δειγμάτων παρέμειναν σε κλίβανο στους 60° C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Μετά την αποπαραφίνωση των τομών με εμβάπτιση σε ξυλόλη (2 x 15 min) και ενυδάτωση σε κατιούσα συγκέντρωση αλκοολών (100% αιθανόλη – 10 min, 100% αιθανόλη – 2 min, 96% αιθανόλη – 1 min, 96% αιθανόλη – 1 min) και έκπλυση με απεσταγμένο νερό για 5 min, οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα κιτρικού οξέος (pH = 6) και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 30 λεπτά (850 Watt). Στη συνέχεια, οι τομές ψύχθηκαν, ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) 3% για 10 λεπτά με στόχο την κατανάλωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Μετά την έκπλυση με απεσταγμένο νερό και διάλυμα TBST (3 x 5 min), οι τομές επώαστηκαν με 200 μl η κάθε μία, του διαλύματος του πρωτογενούς αντισώματος (μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, Novus Biological, αραιώση 1:200) για όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 4° C. Την επόμενη μέρα, οι τομές εκπλύθηκαν με TBST (3 x 5 min) και προστέθηκαν 200 μl του αντιδραστηρίου Envision (DAKO, πολυμερές συζευγμένο με υπεροξειδάση που φέρει αντισώματα έναντι των ανοσοσφαιρινών του κουνελιού και του ποντικού) και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πάροδο των 30 λεπτών, ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα TBST (3 x 5 min) και προστέθηκε 200 μl του διαλύματος χρωμογόνου 3,3 τετραυδροχλωρική διαμινοβενζιδίνη (DAB) και οι τομές επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση με απεσταγμένο νερό και εναντιοχρωμασία με αιματοξυλίνη Harris 10% για 2 λεπτά. Τέλος, οι τομές εκπλύθηκαν με νερό βρύσης, αφυδατώθηκαν σε ανιούσα συγκέντρωση αλκοολών (96% αιθανόλη – 1 min, 96% αιθανόλη – 1 min, 100% αιθανόλη – 1 min, 100% αιθανόλη – 1 min), εμβάπτιστηκαν σε ξυλόλη (2 x 1 min) και τοποθετήθηκαν σε αυτές καλυπτρίδες. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από καρκίνο νεφρού ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από φυσιολογικά ποντίκια.

2.6 Έκφραση του HIF – 1α

Οι τομές παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Leica DM2000 και φωτογραφήθηκαν σε μεγέθυνση 40x. Η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με την κάμερα Leica DFC490 και το πρόγραμμα Leica Application Suite version 2.8.1. Στη συνέχεια, οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν ως προς τη φωτεινότητα με τη χρήση του λογισμικού <<Image J for microscopy>>.

2.7 Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του HIF – 1α

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του HIF – 1α βασίστηκε στην έκταση και στην ένταση της χρώσης. Για τον υπολογισμό των επιπέδων του HIF – 1α χρησιμοποιήθηκε το “Q score” (Quick score), το οποίο δίνεται από τον τύπο:

$Q = \text{Ποσοστό πυρήνων που εκφράζουν τον HIF – 1α} \times \text{Ένταση χρώσης}$

Δηλαδή, $Q = P \times I$

Το ποσοστό των πυρήνων που εκφράζουν τον HIF – 1α υπολογίστηκε μετρώντας τον αριθμό των πυρήνων που εκφράζουν τον HIF – 1α (καφέ χρώμα) στην περιοχή της αθηρωματικής πλάκας και στη συνέχεια το άθροισμα αυτό διαιρέθηκε με το συνολικό αριθμό των πυρήνων στην περιοχή της αθηρωματικής πλάκας, δηλαδή το άθροισμα των πυρήνων που εκφράζουν τον HIF – 1α (καφέ χρώμα) με τους πυρήνες που δεν τον εκφράζουν (μπλε χρώμα).

Η ένταση της χρώσης υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω κλίμακα ⁽⁴²⁾(Εικόνα 21):

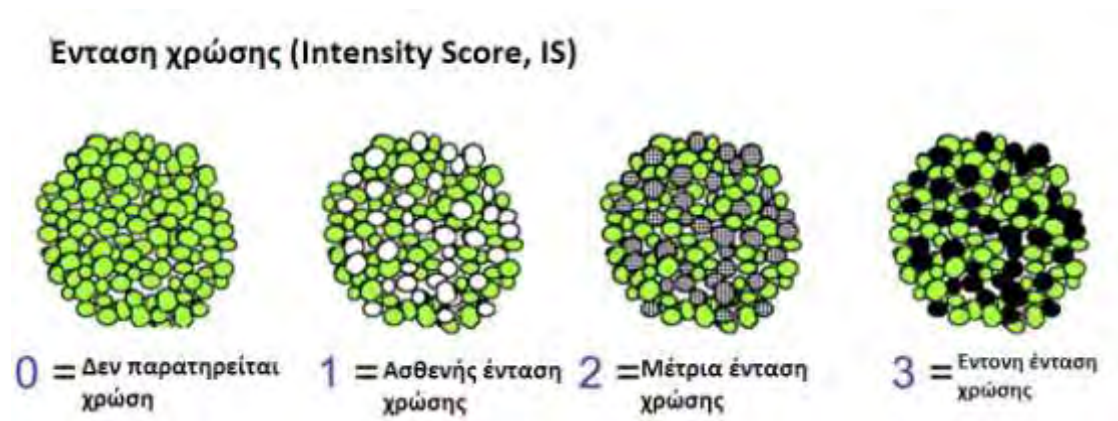
0 πόντοι → δεν παρατηρείται χρώση

1 πόντος → ασθενής ένταση χρώσης

2 πόντοι → μέτρια ένταση χρώσης

3 πόντοι → έντονη ένταση χρώσης

Η μέγιστη τιμή που μπορεί να έχει το Q είναι 300, ενώ η ελάχιστη είναι 0.



Εικόνα 21: Κλίμακα υπολογισμού της έντασης της χρώσης ⁽⁴²⁾

2.8 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με one-way ANOVA μεταξύ των ομάδων και 2 – tailed unpaired Student’ s t test. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα .

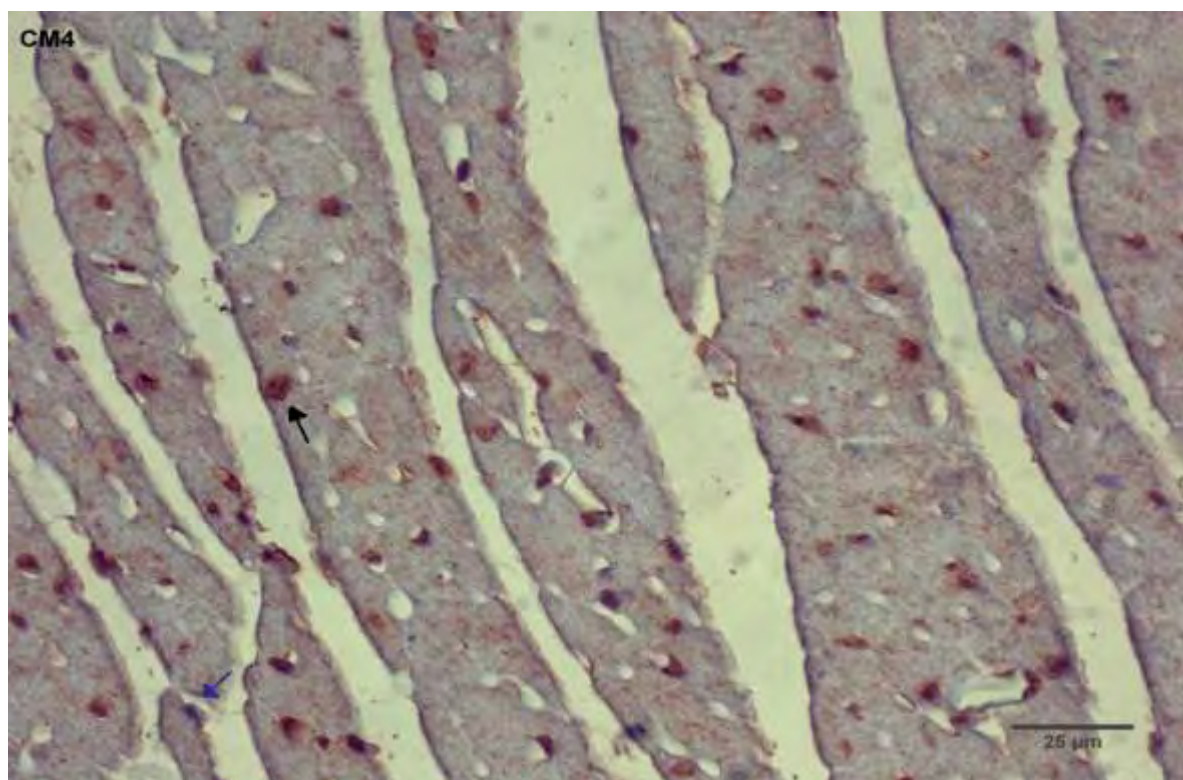
3. Αποτελέσματα

Ο προσδιορισμός της έκφρασης του HIF – 1α έγινε με ανοσοϊστοχημική μέθοδο στις τομές της εγγύς ανιούσας αορτής ApoE knockout ποντικών, στα οποία είχε προηγηθεί αγωγή με υδροξυχλωροκίνη με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφεται ανωτέρω στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Οι τομές παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο για την ανίχνευση της έκφρασης του HIF – 1α και η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του HIF – 1α πραγματοποιήθηκε με βάση την ένταση και την έκταση της χρώσης.

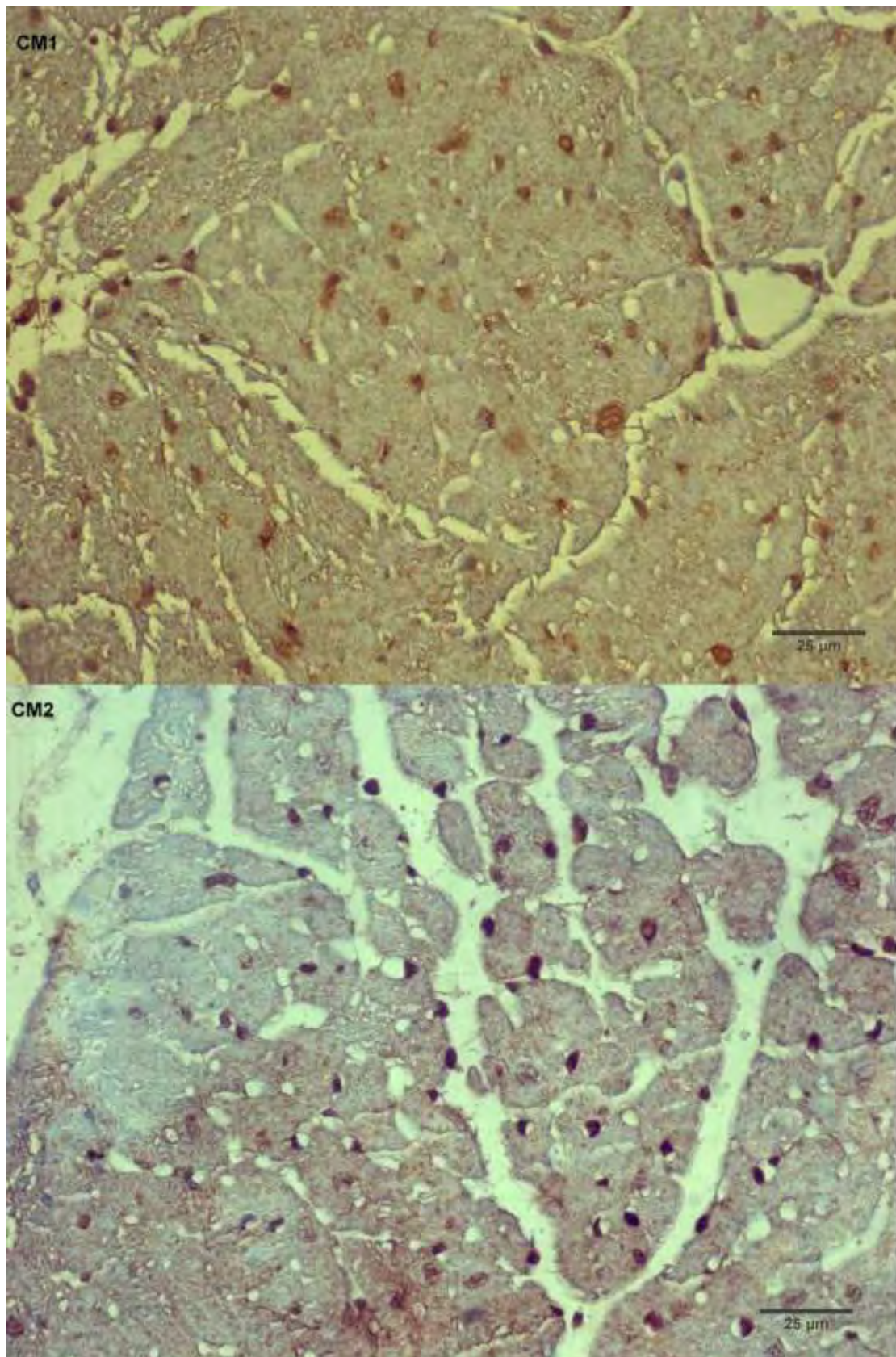
3.1 Έκφραση του HIF – 1α

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά εβδομήντα (70) ApoE knockout ποντίκια. Από αυτά, χορηγήθηκε υδροξυχλωροκίνη σε εικοσιτέσσερα (24) αρσενικά (HM) και σε εικοσιτέσσερα (24) θηλυκά (HF) ενώ ως μάρτυρες (controls) χρησιμοποιήθηκαν δέκα (10) αρσενικά (CM) και δώδεκα (12) θηλυκά ποντίκια (CF).

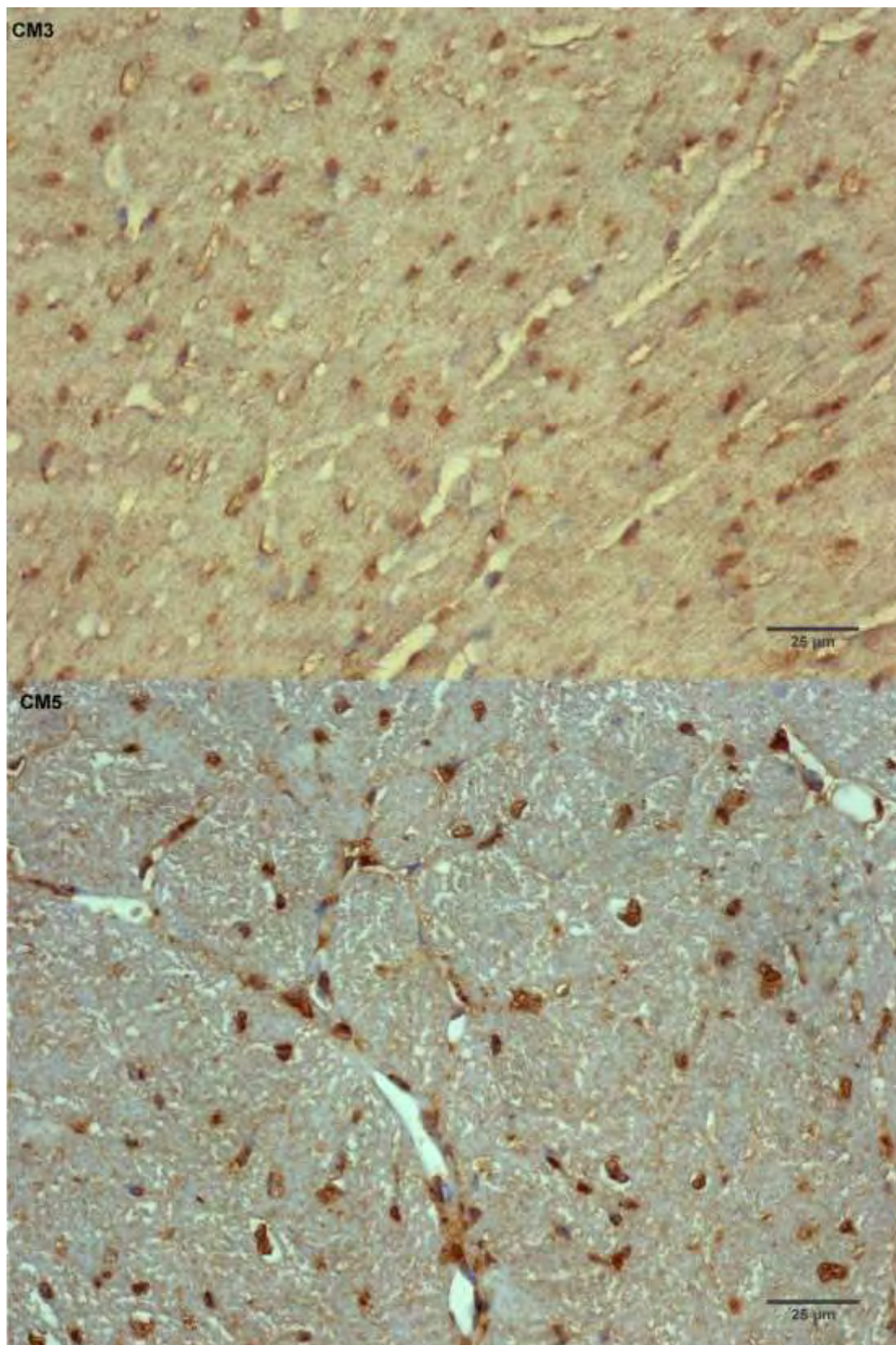
Η έκφραση του HIF – 1α μελετήθηκε στις αθηροσκληρυντικές πλάκες της εγγύς ανιούσας αορτής των ποντικών αυτών. Στο οπτικό μικροσκόπιο, οι πυρήνες που εκφράζουν τον HIF – 1α εμφανίζονται καφέ ενώ οι πυρήνες που δεν τον εκφράζουν έχουν μπλε χρώμα, όπως φαίνεται στις εικόνες που ακολουθούν.



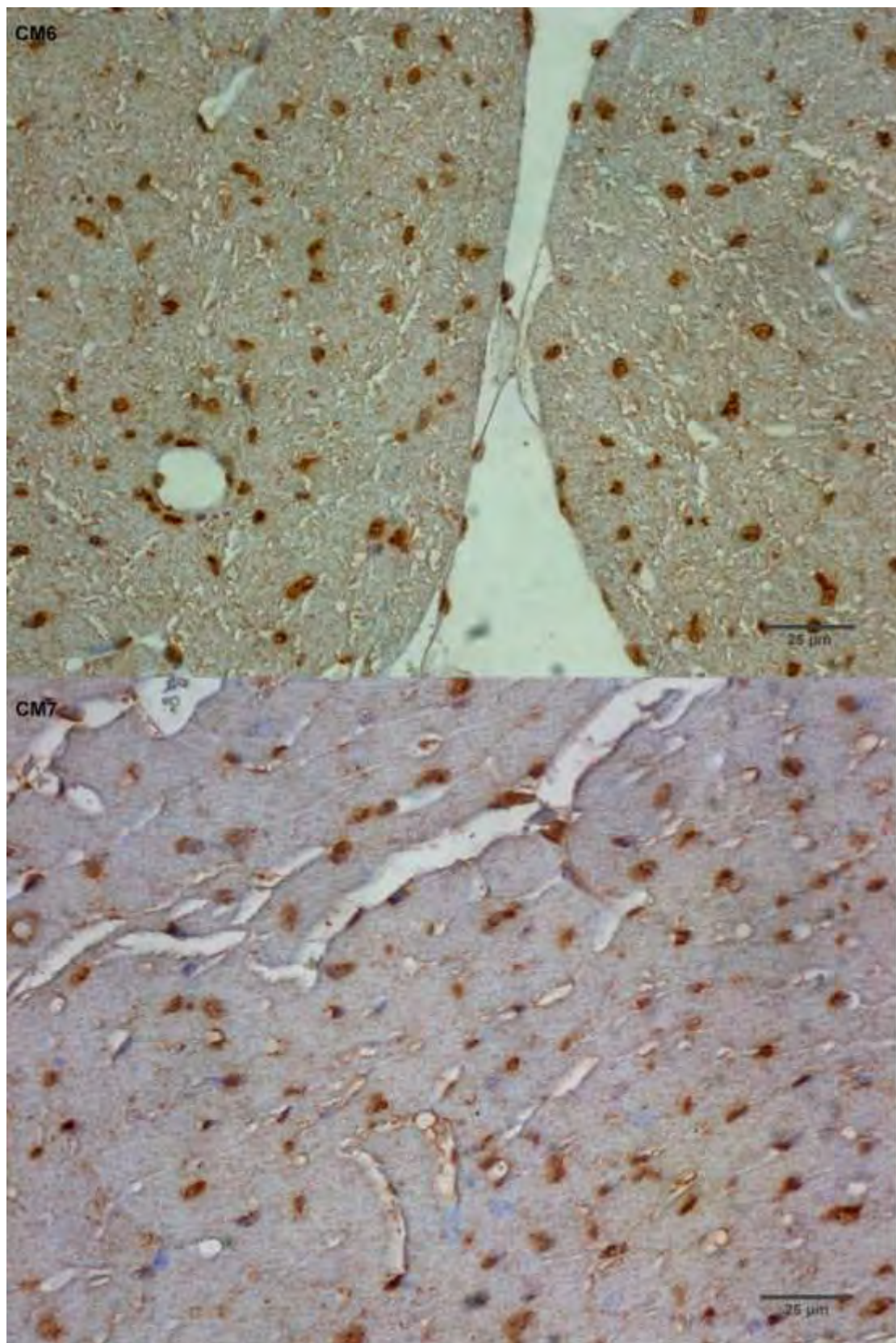
Εικόνα 22: Αθηροσκληρυντική πλάκα σε μεγέθυνση 40x. Οι πυρήνες που εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν καφέ χρώμα (μαύρο βέλος) ενώ οι πυρήνες που δεν εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν μπλε χρώμα (μπλε βέλος)



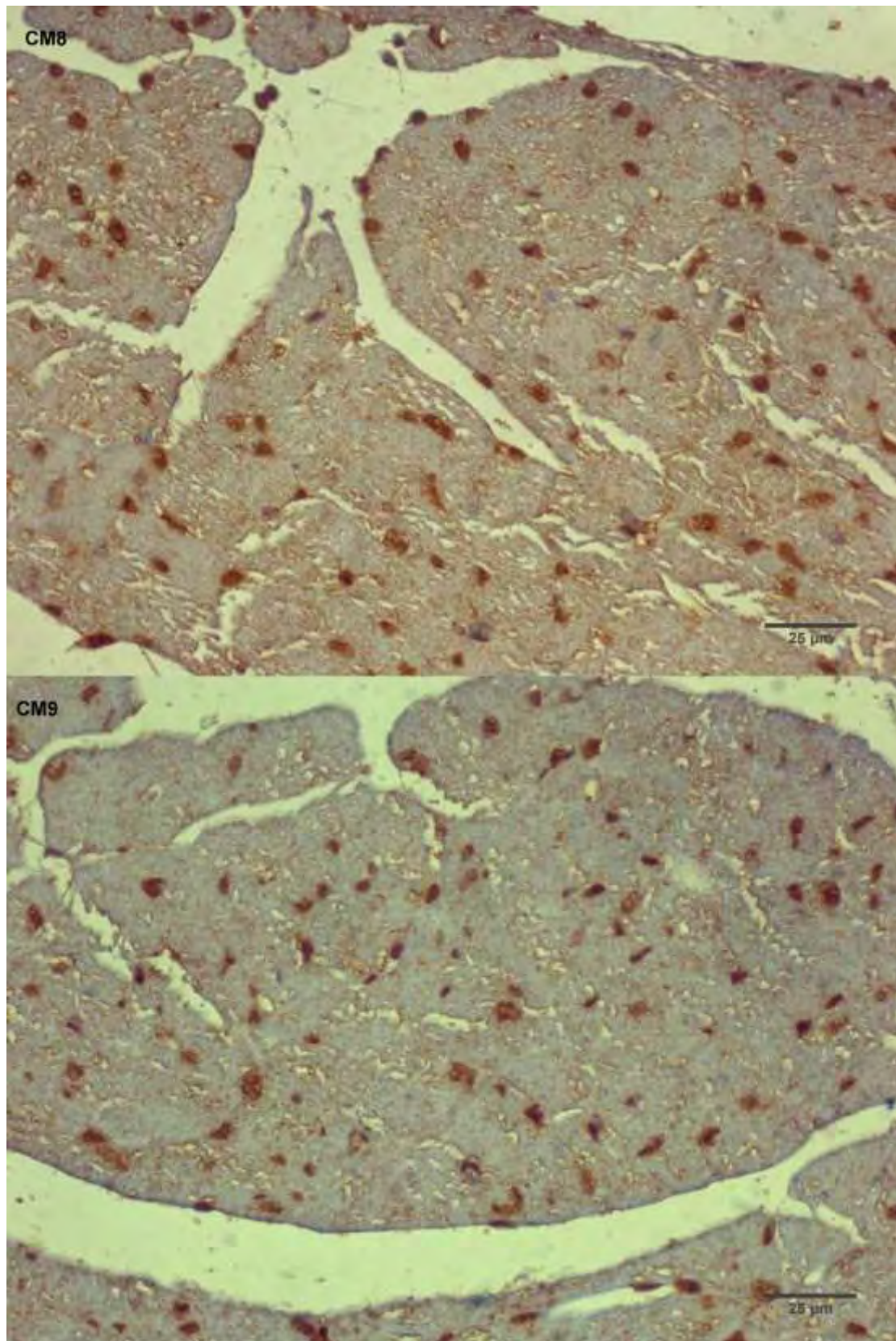
Εικόνα 23: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (CM1, CM2) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



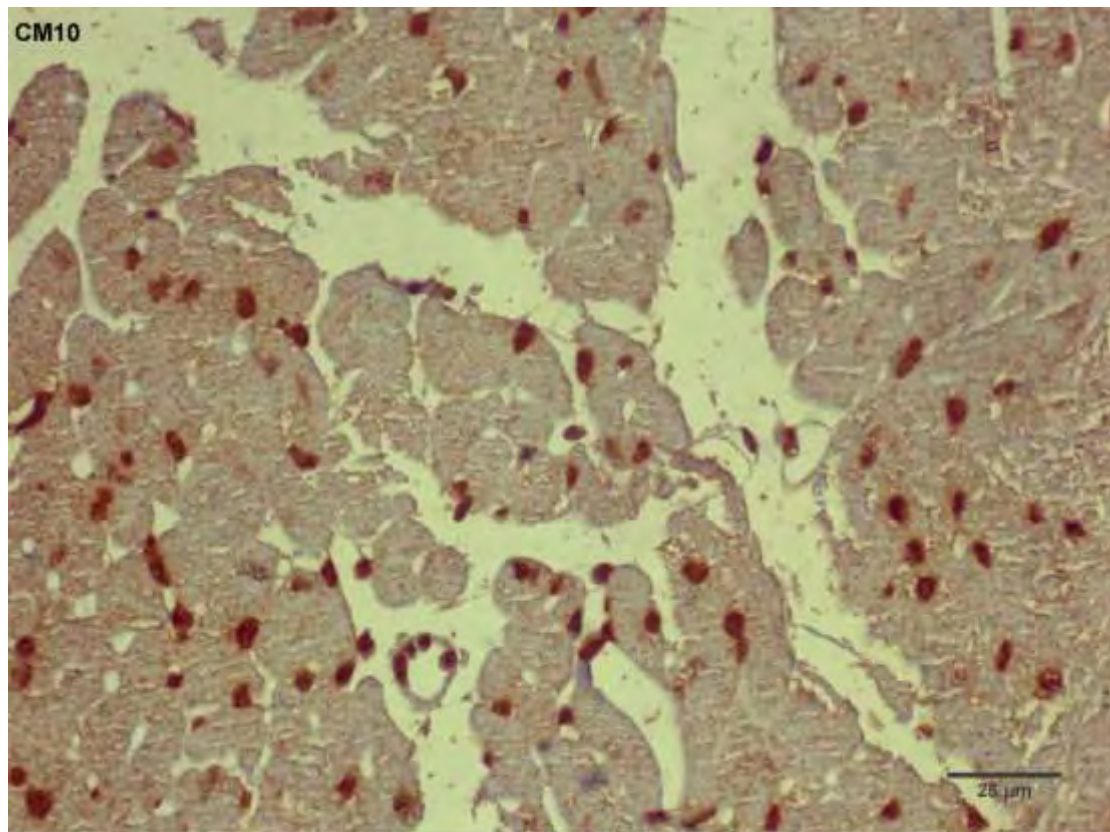
Εικόνα 24: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (CM3, CM5) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



Εικόνα 25: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (CM6, CM7) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη

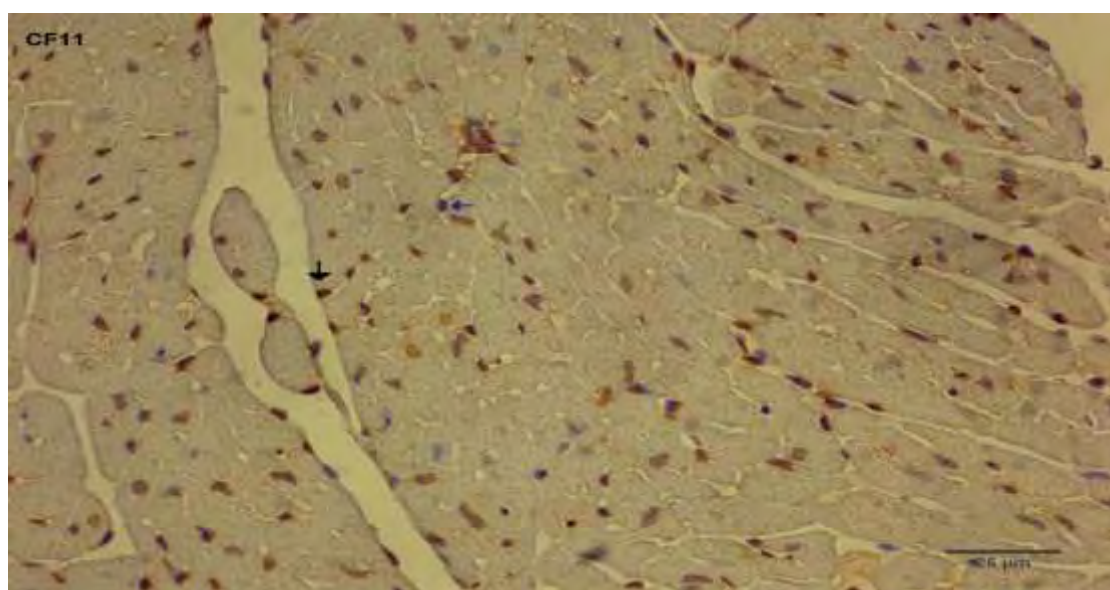


Εικόνα 26: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (CM8, CM9) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη

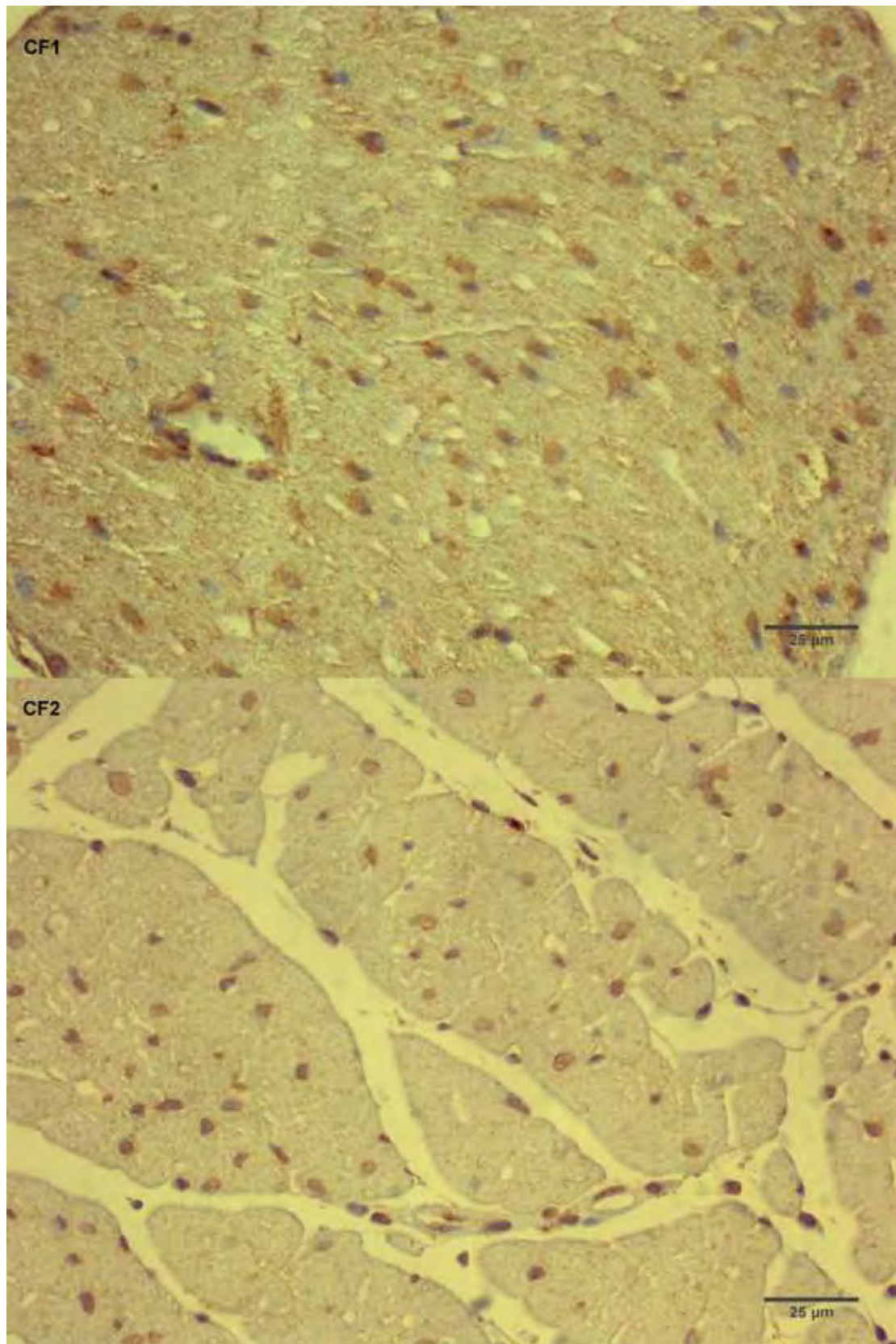


Εικόνα 27: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) του αρσενικού ποντικού (CM10) που δεν έλαβε αγωγή με υδροξυχλωροκίνη

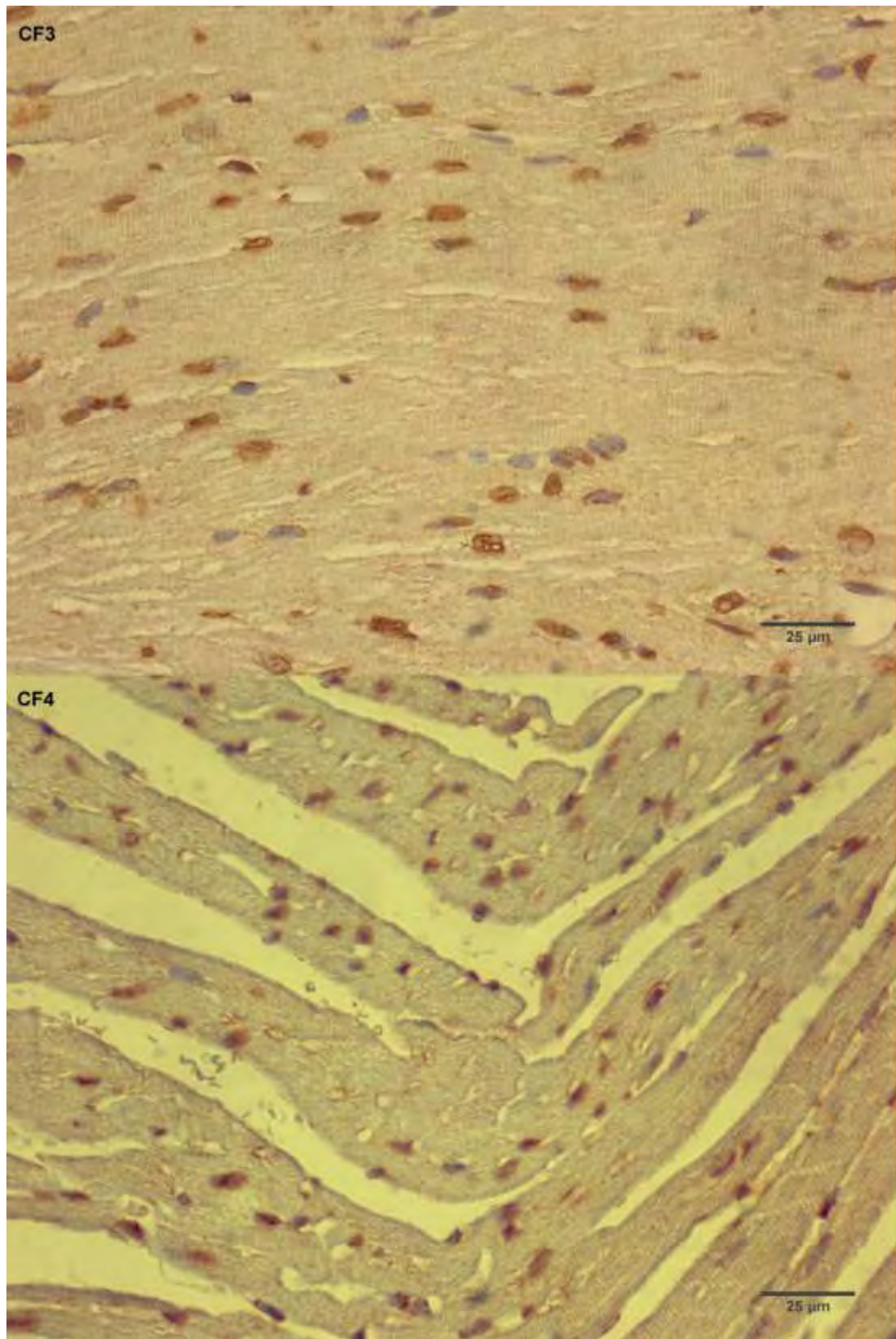
Οι αθηροσκληρυντικές πλάκες όλων των αρσενικών ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (controls: CM1 – CM10), δηλαδή δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη, φαίνεται ότι εκφράζουν σημαντικά τον HIF – 1α. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού είναι γνωστό ότι στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των ApoE knock-out ποντικών, ο HIF – 1α υπερεκφράζεται⁽³⁹⁾. Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των θηλυκών μαρτύρων (CF1 – CF12), όπως φαίνεται στις εικόνες που ακολουθούν.



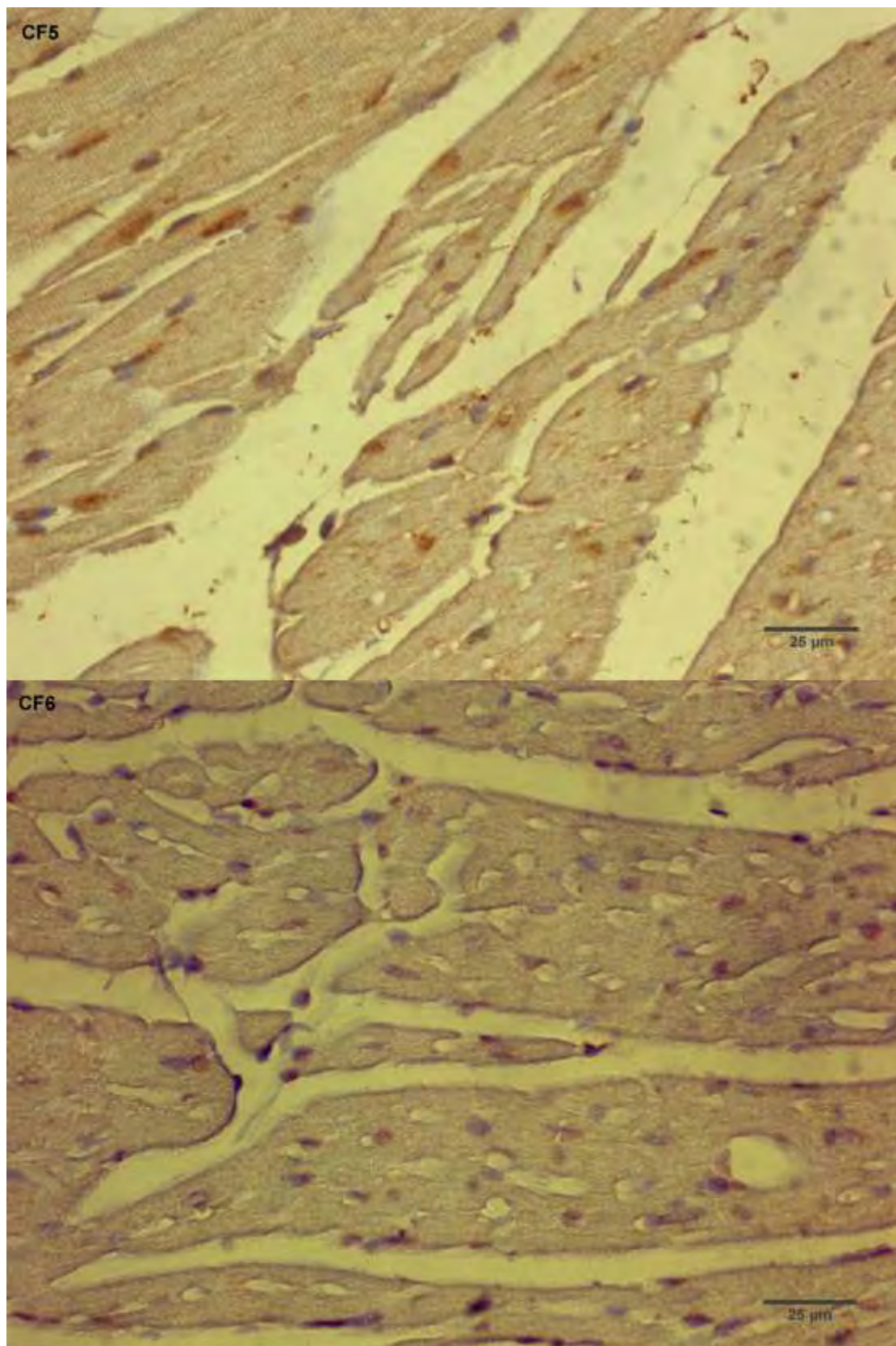
Εικόνα 28: Αθηροσκληρυντική πλάκα σε μεγέθυνση 40x. Οι πυρήνες που εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν καφέ χρώμα (μαύρο βέλος) ενώ οι πυρήνες που δεν εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν μπλε χρώμα (μπλε βέλος)



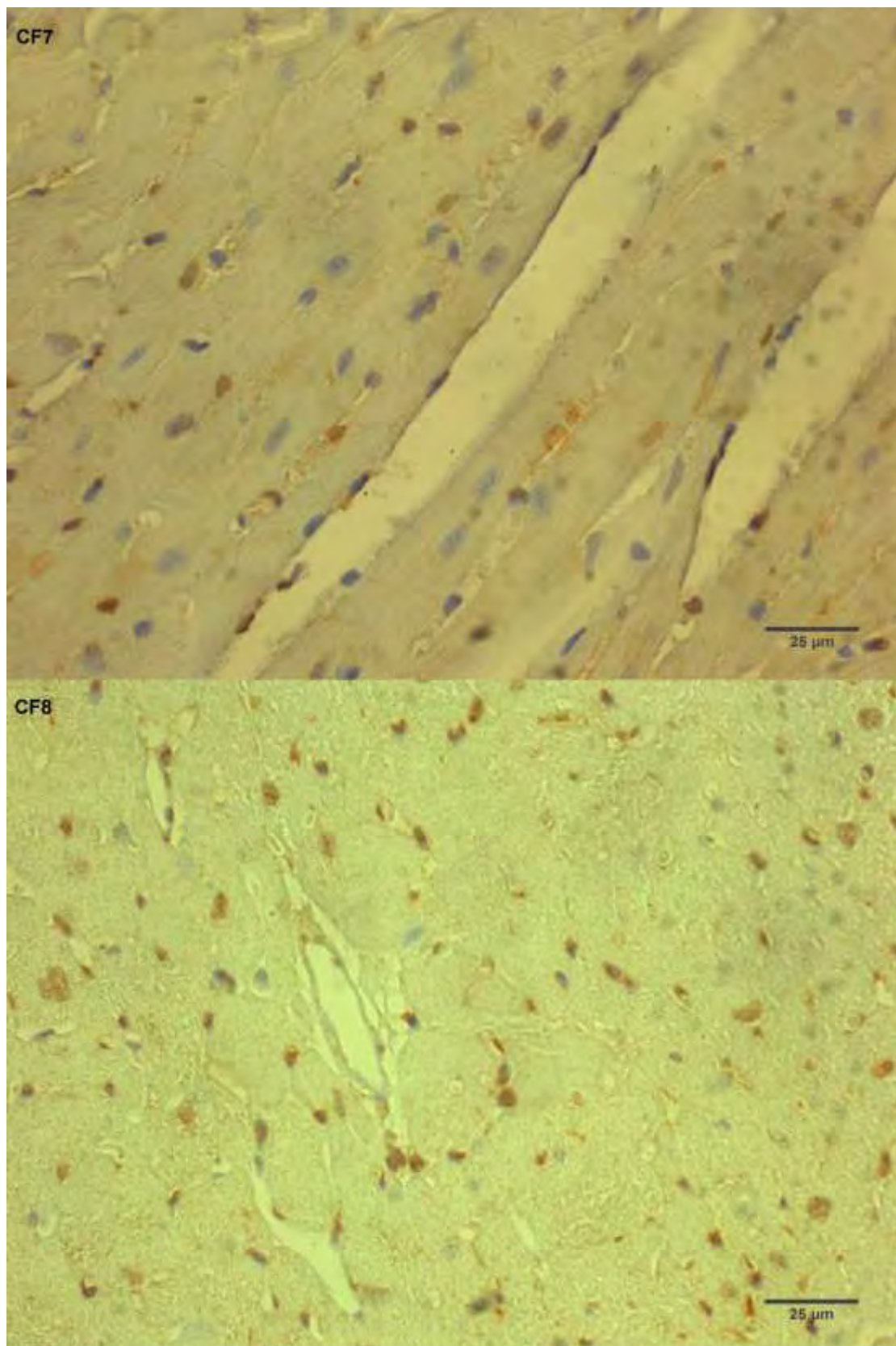
Εικόνα 29: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF1, CF2) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



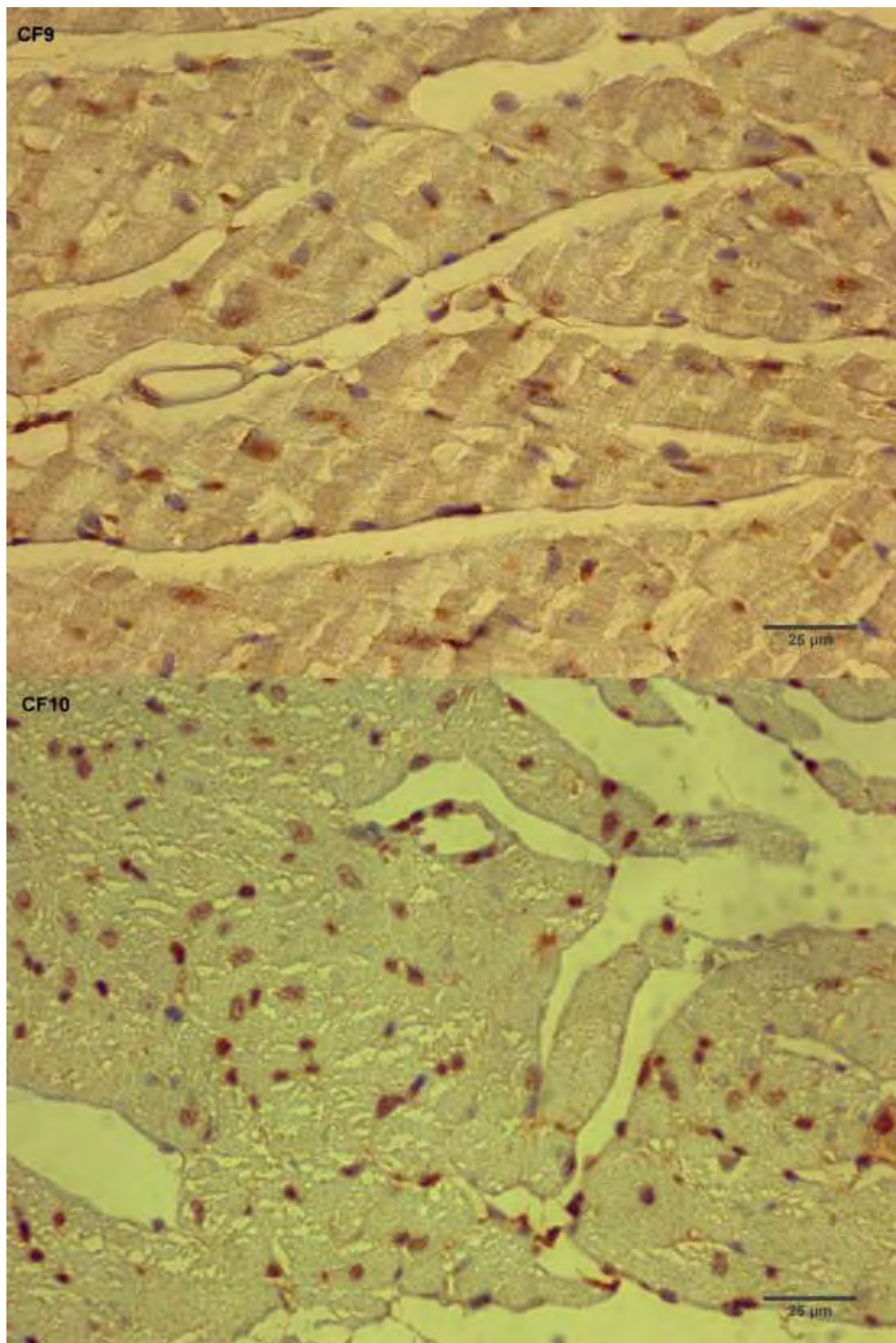
Εικόνα 30: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF3, CF4) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



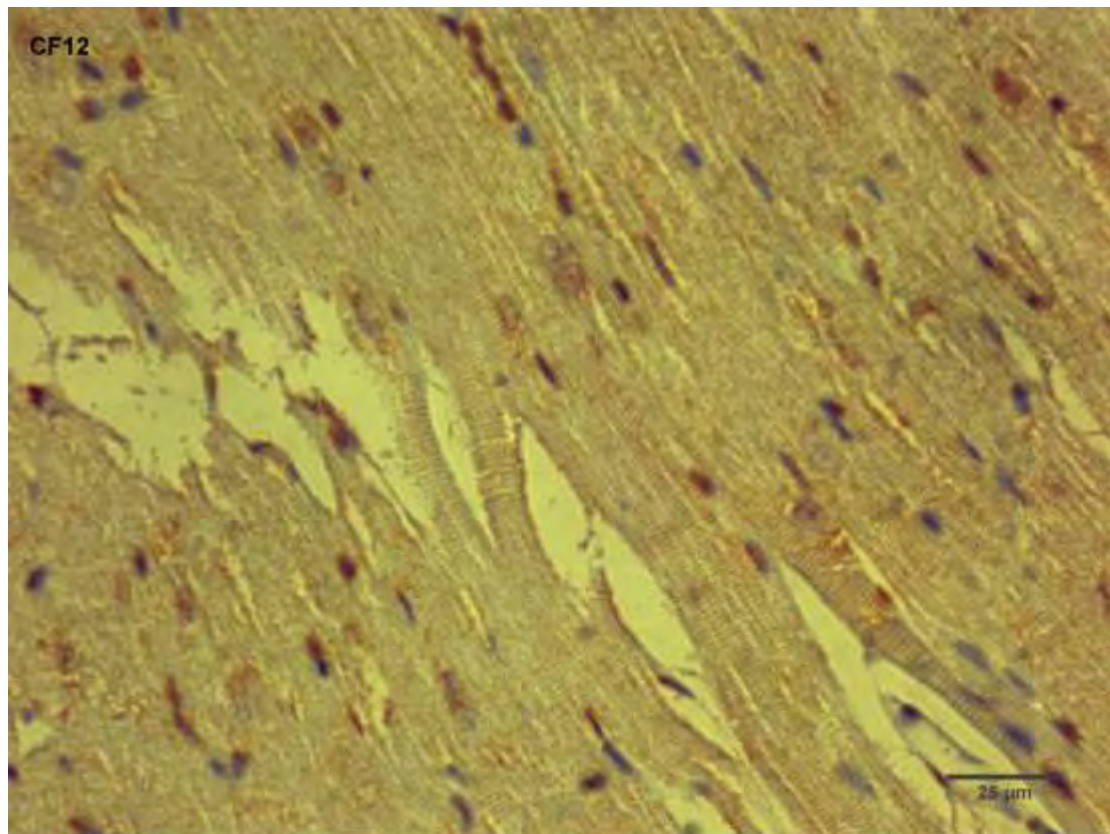
Εικόνα 31: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF5, CF6) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



Εικόνα 32: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF7, CF8) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη

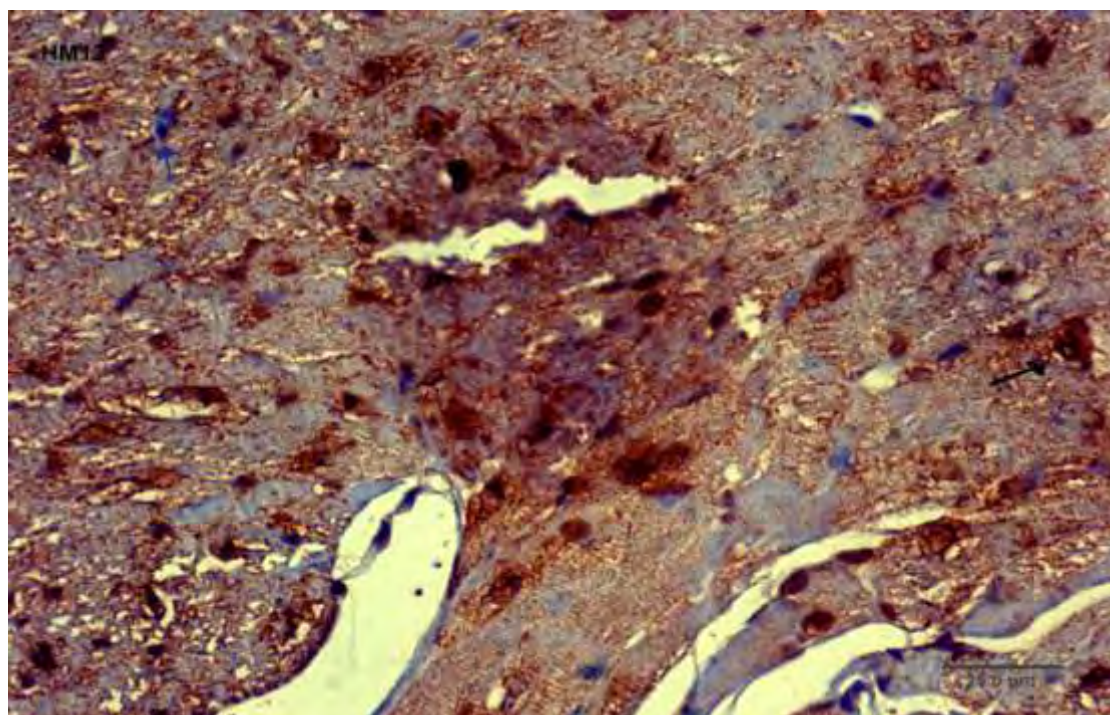


Εικόνα 33: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (CF9, CF10) που δεν έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη

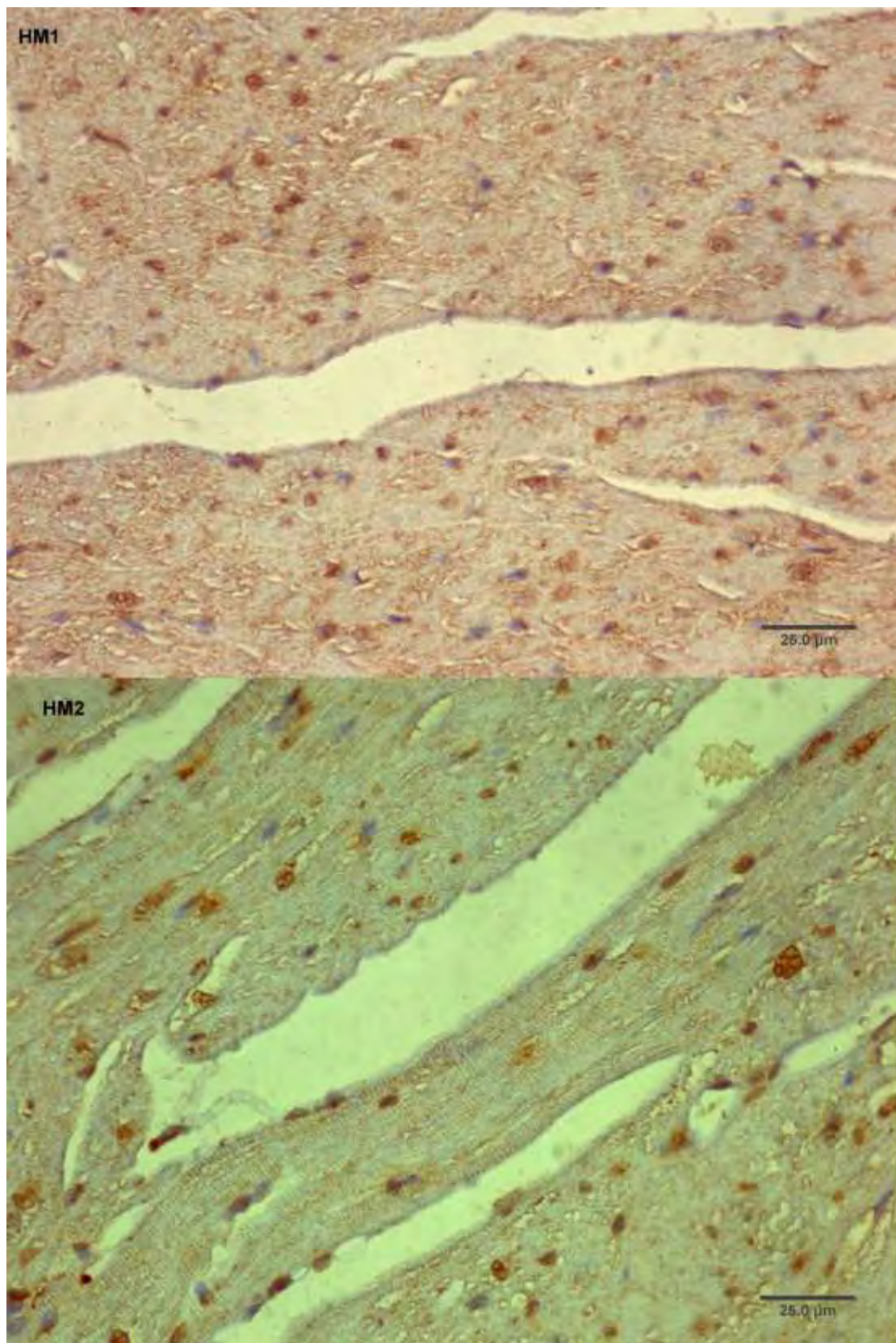


Εικόνα 34: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) του θηλυκού ποντικού (CF12) που δεν έλαβε αγωγή με υδροξυχλωροκίνη

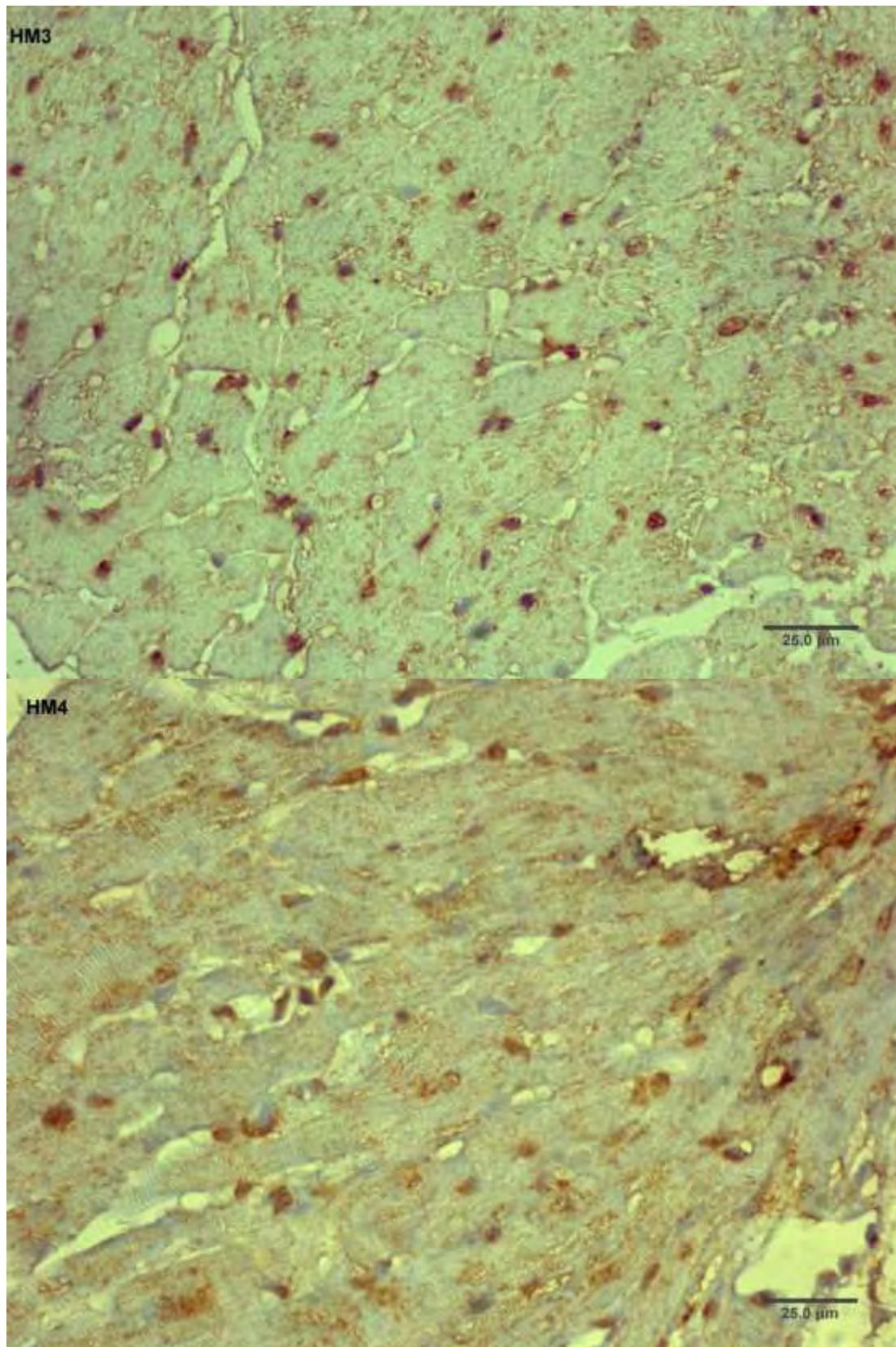
Όσον αφορά στα ApoE knockout ποντίκια, που υποβλήθηκαν σε αγωγή με υδροξυχλωροκίνη, φαίνεται να υπερεκφράζουν και αυτά τον HIF - 1α. Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τόσο στα αρσενικά, όσο και στα θηλυκά ποντίκια.



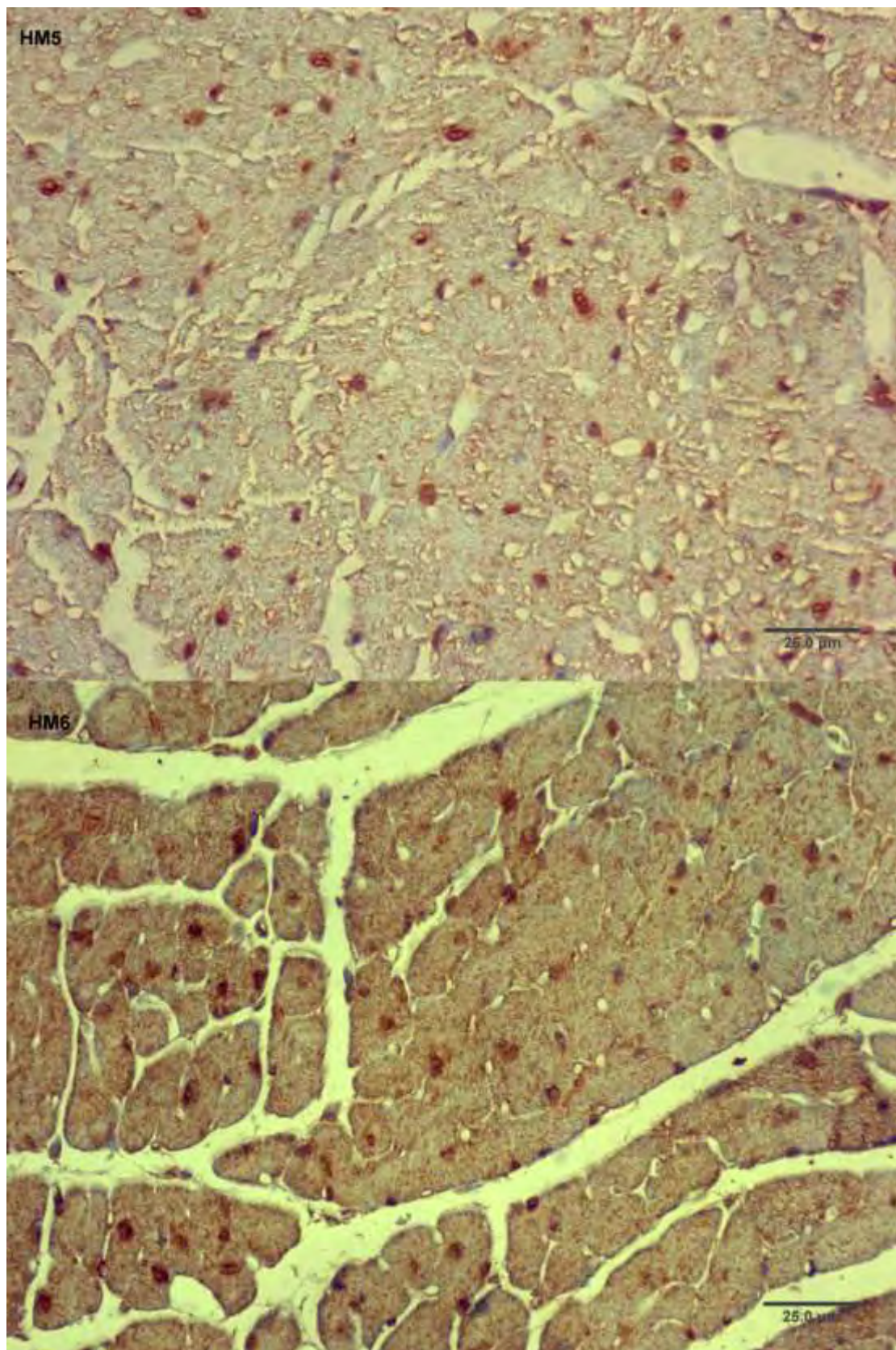
Εικόνα 35: Αθηροσκληρυντική πλάκα σε μεγέθυνση 40x. Οι πυρήνες που εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν καφέ χρώμα (μαύρο βέλος) ενώ οι πυρήνες που δεν εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν μπλε χρώμα (μπλε βέλος)



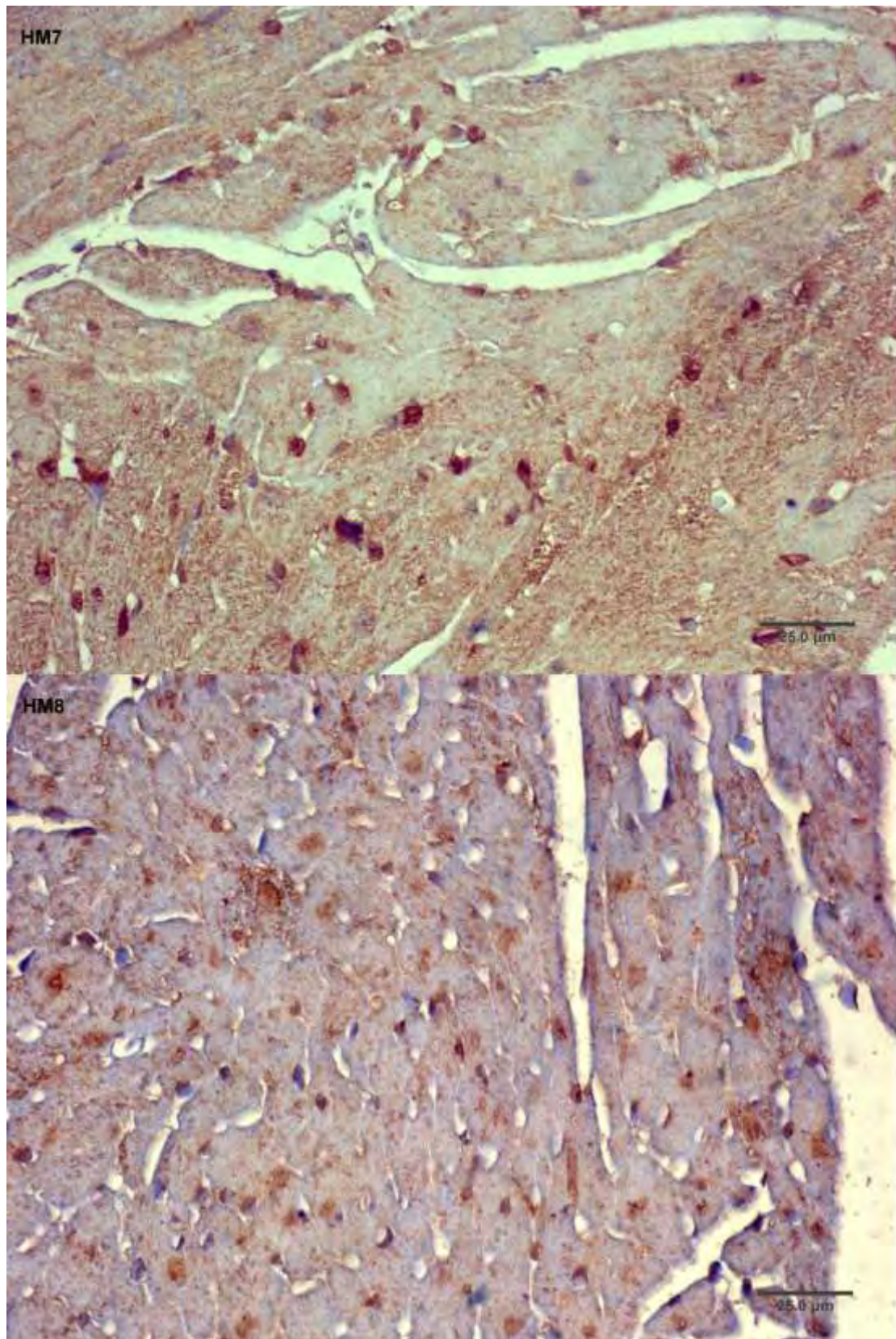
Εικόνα 36: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM1, HM2) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



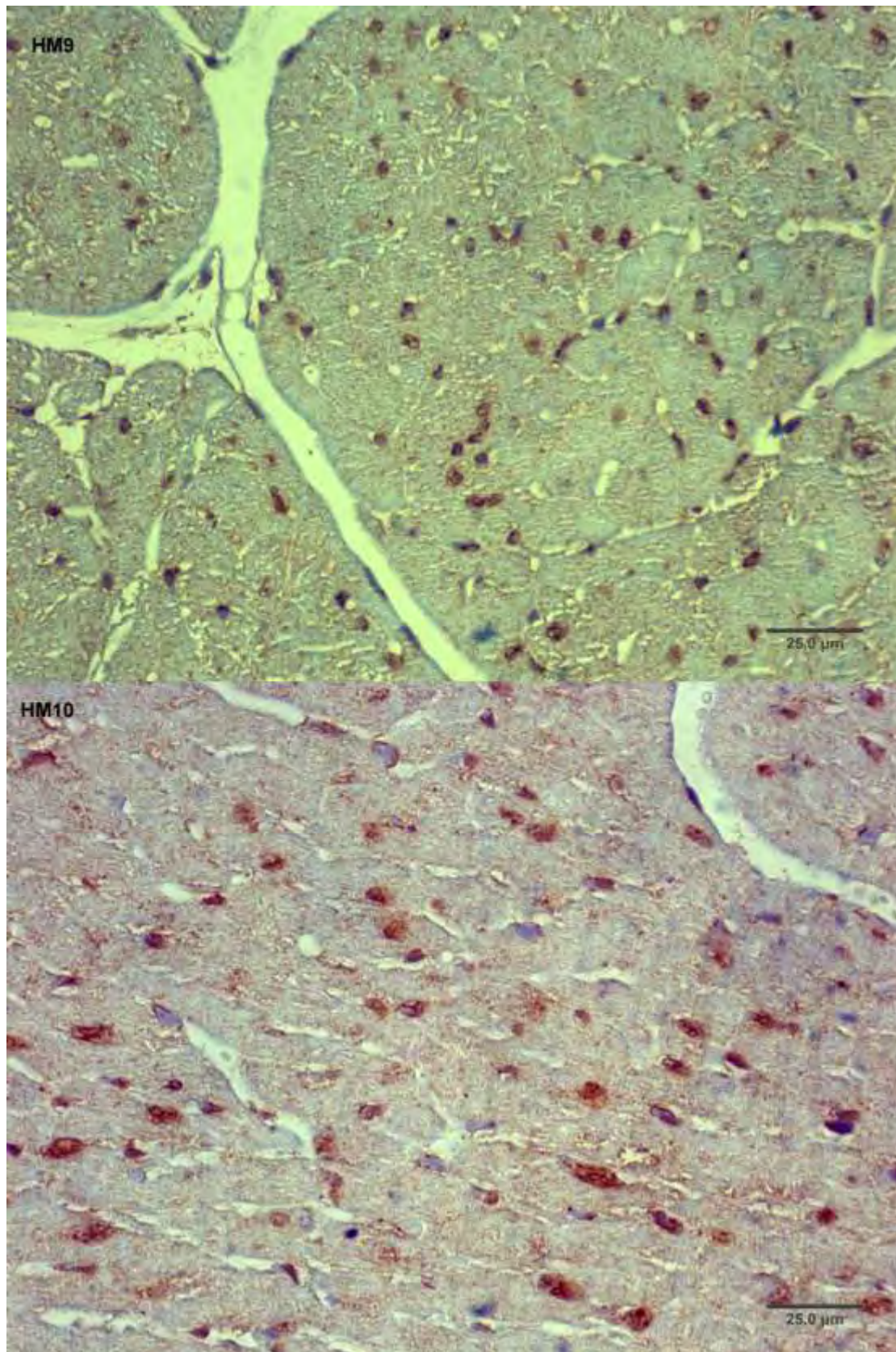
Εικόνα 37: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM3, HM4) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



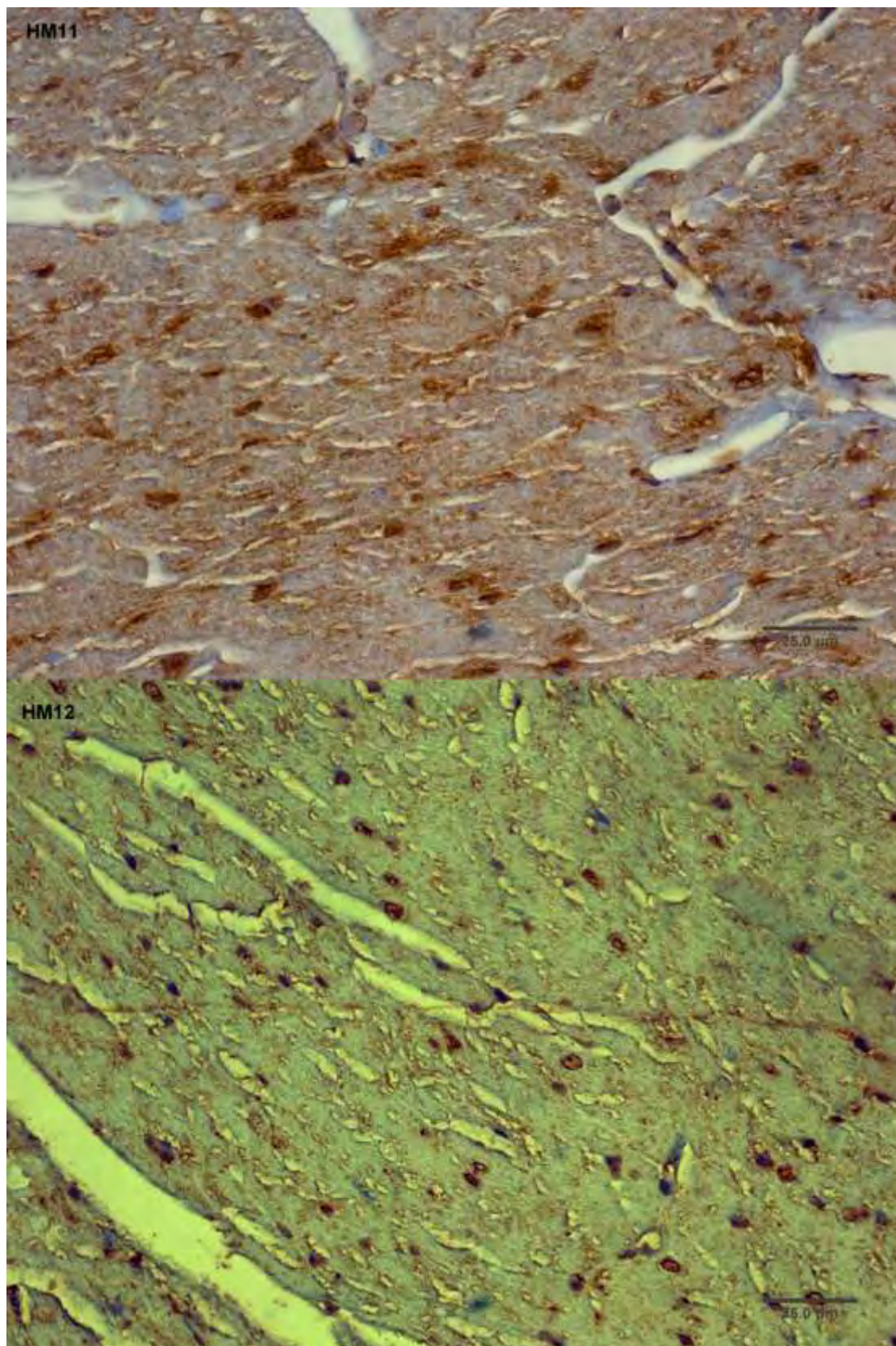
Εικόνα 38: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM5, HM6) που έλαβαν αγωγή με υδροευχλωροκίνη



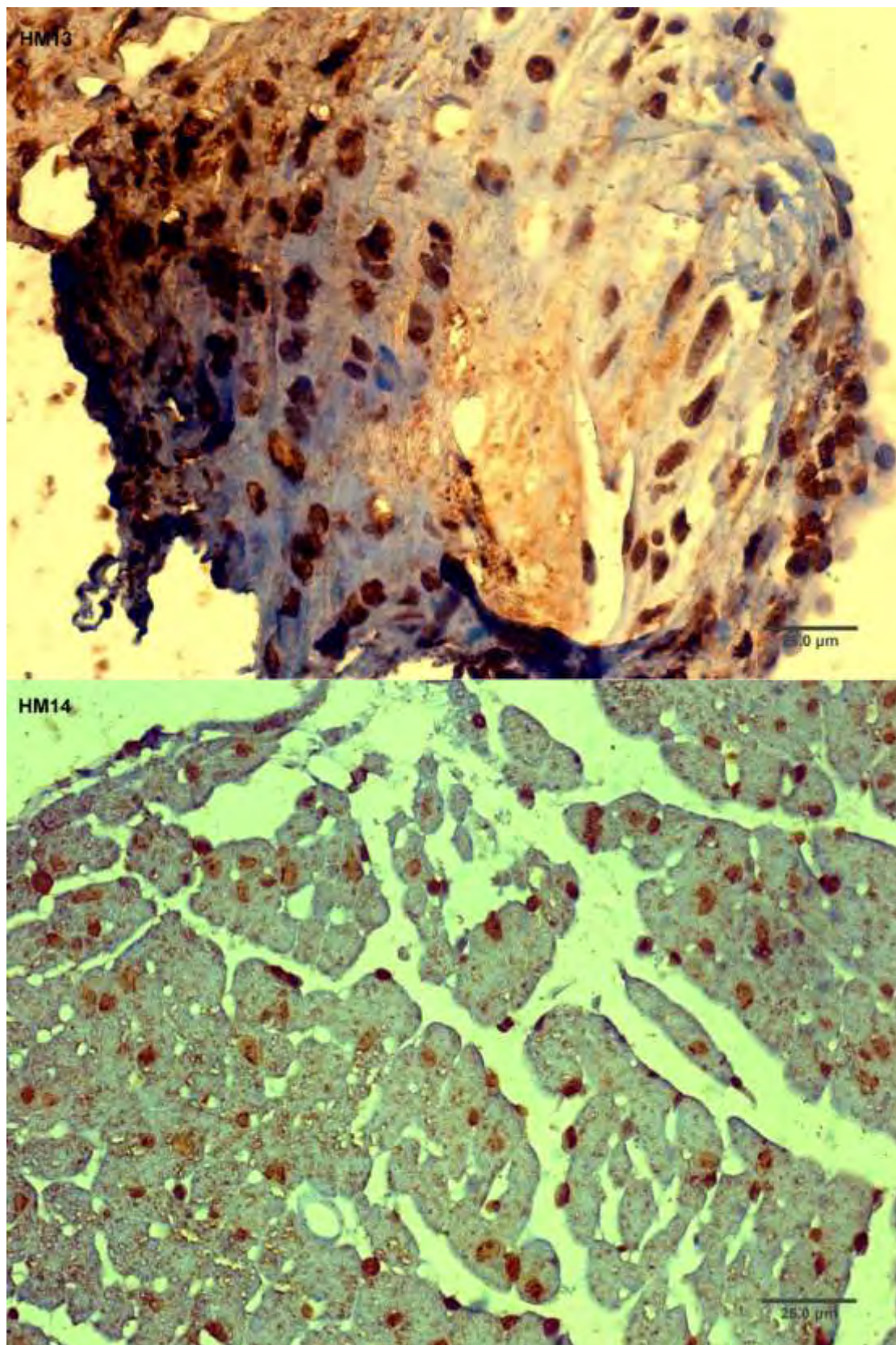
Εικόνα 39: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM7, HM8) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



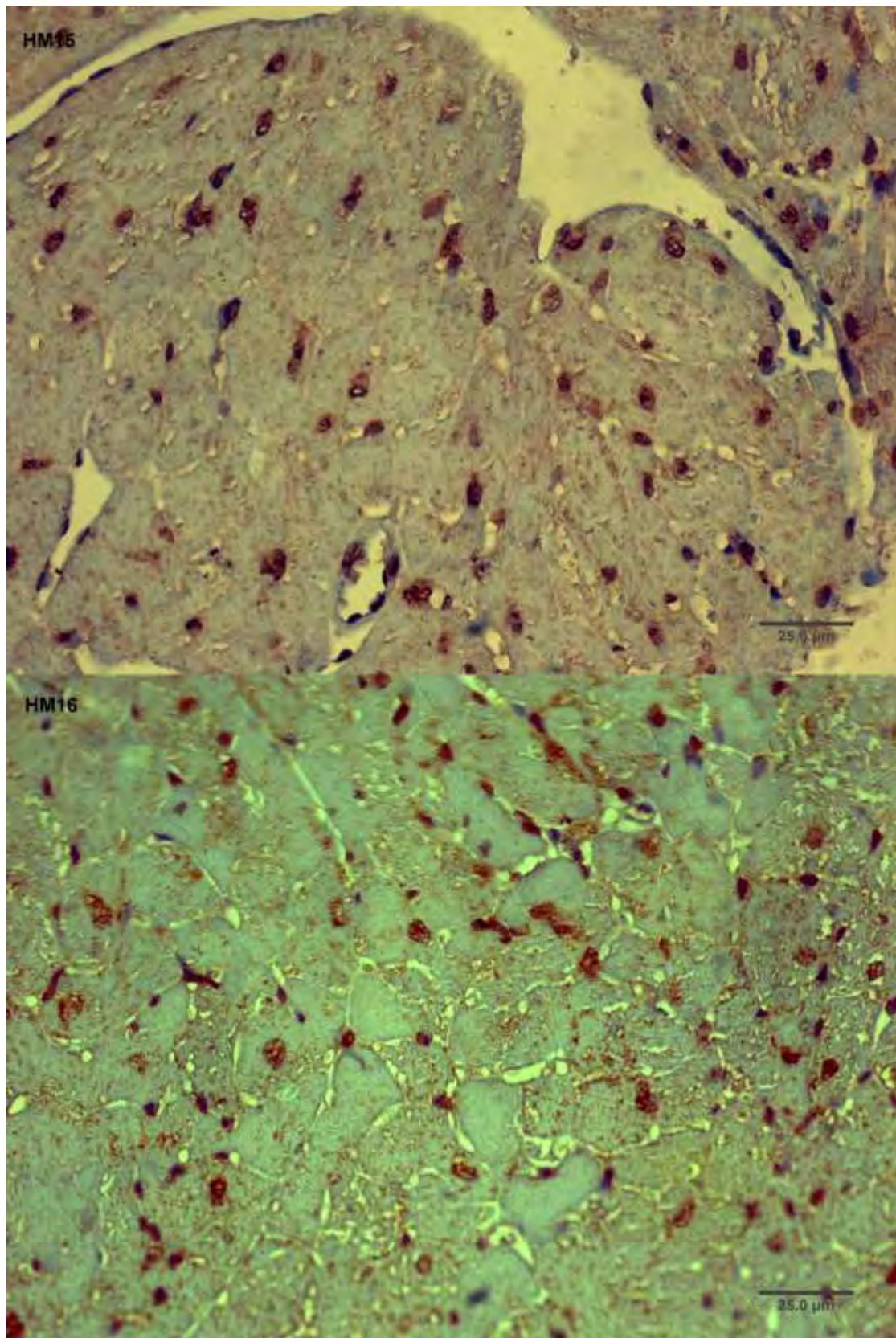
Εικόνα 40: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM9, HM10) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



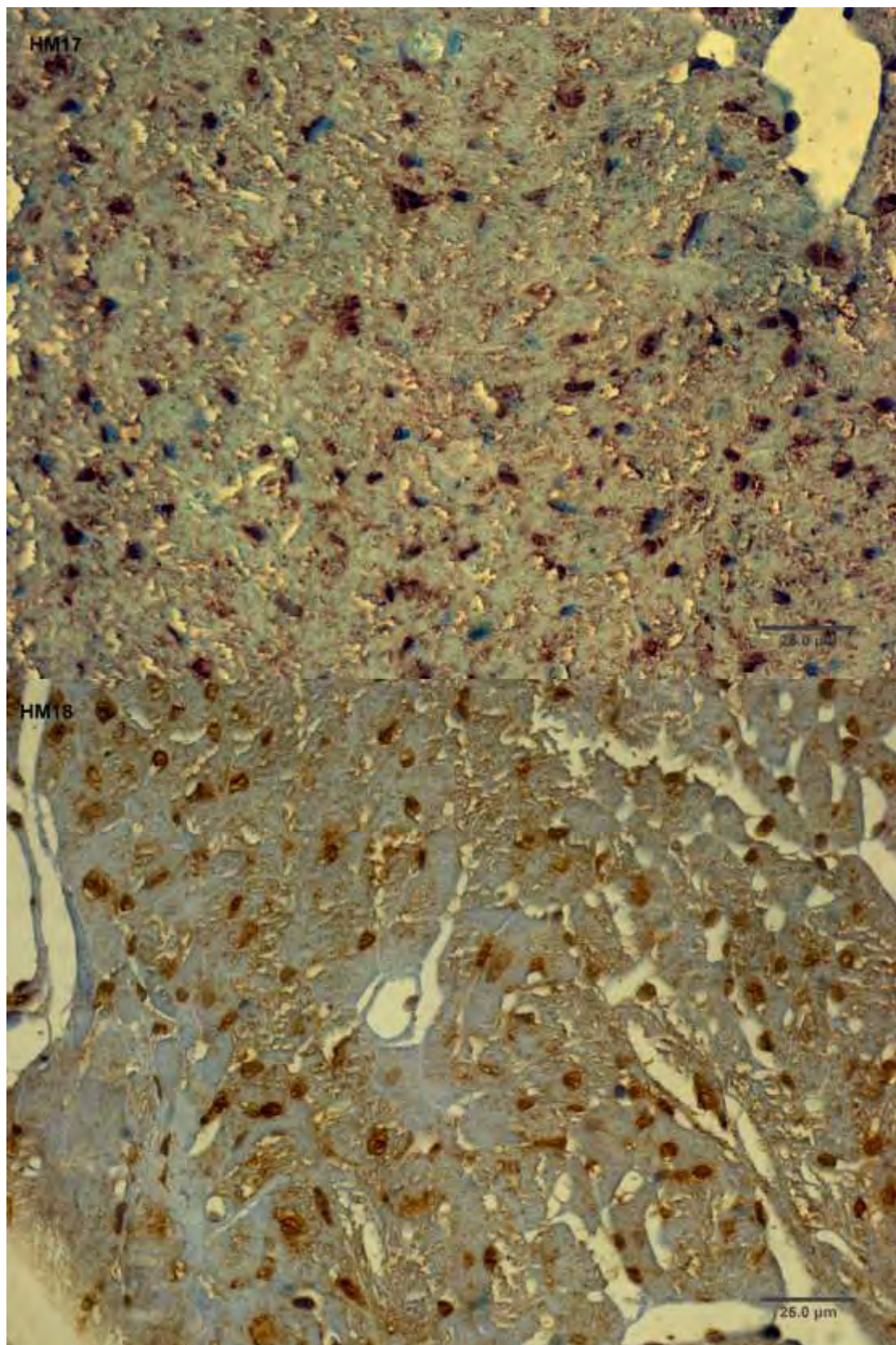
Εικόνα 41: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM11, HM12) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



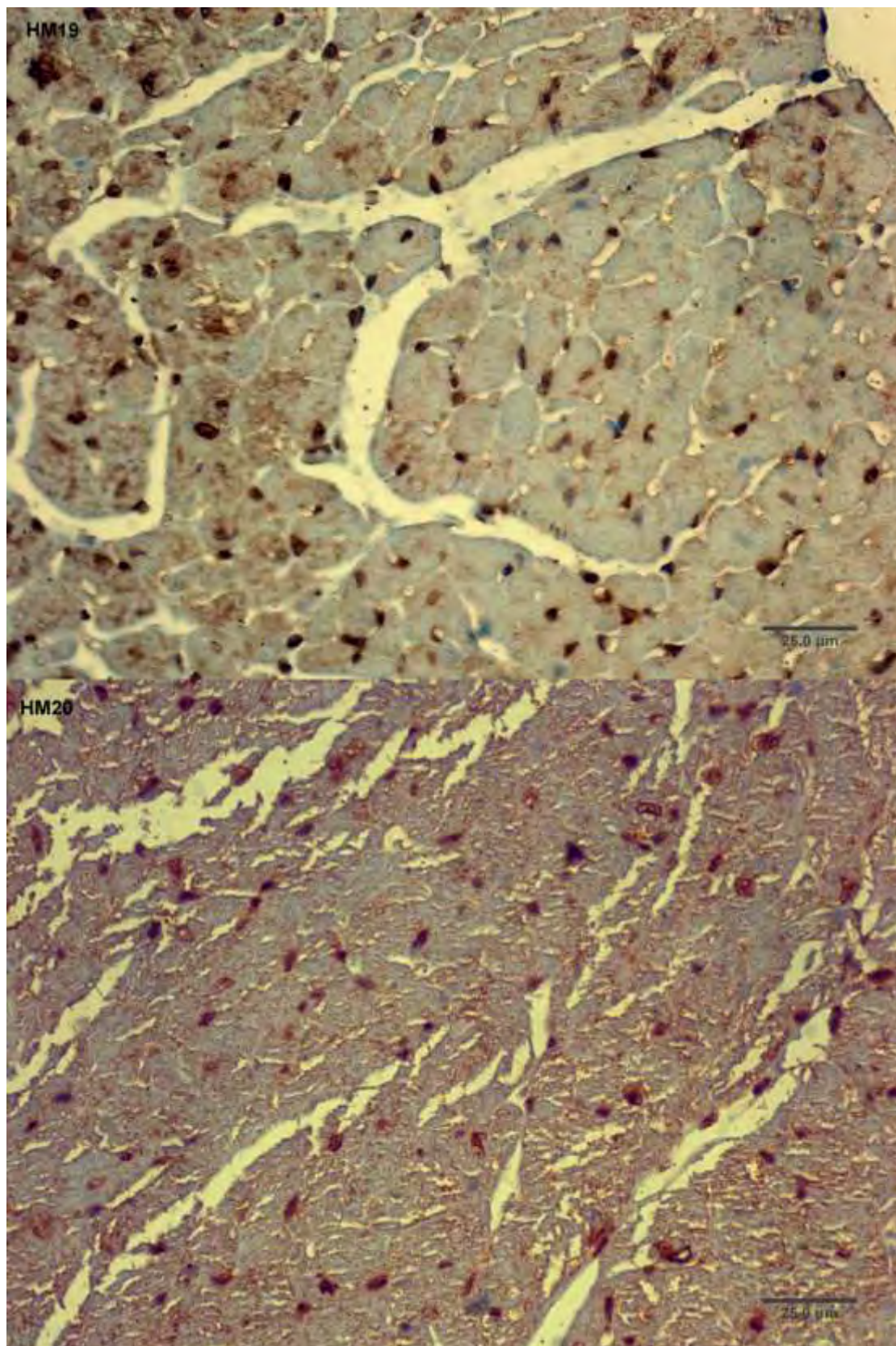
Εικόνα 42: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM13, HM14) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



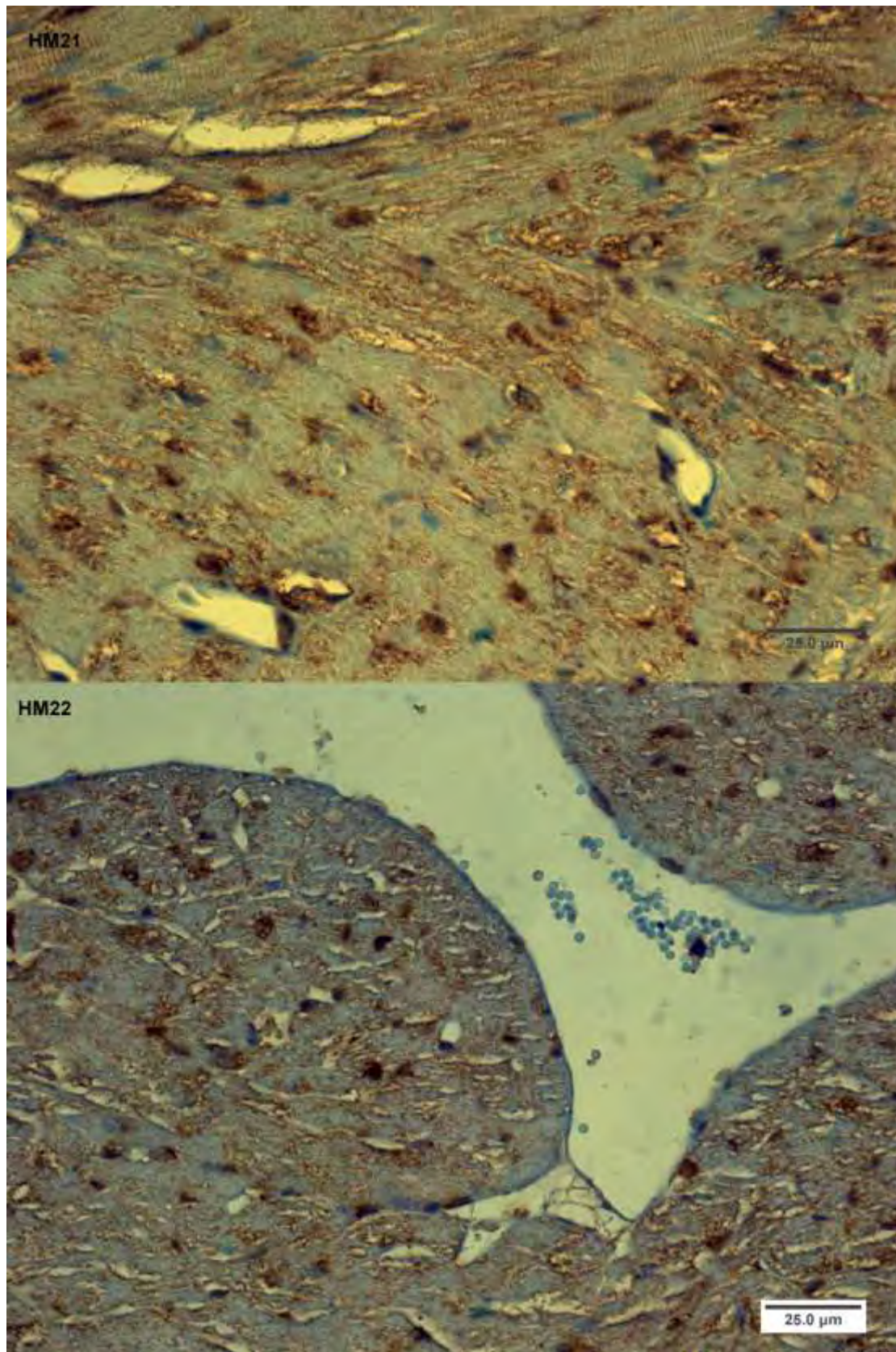
Εικόνα 43: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM15, HM16) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



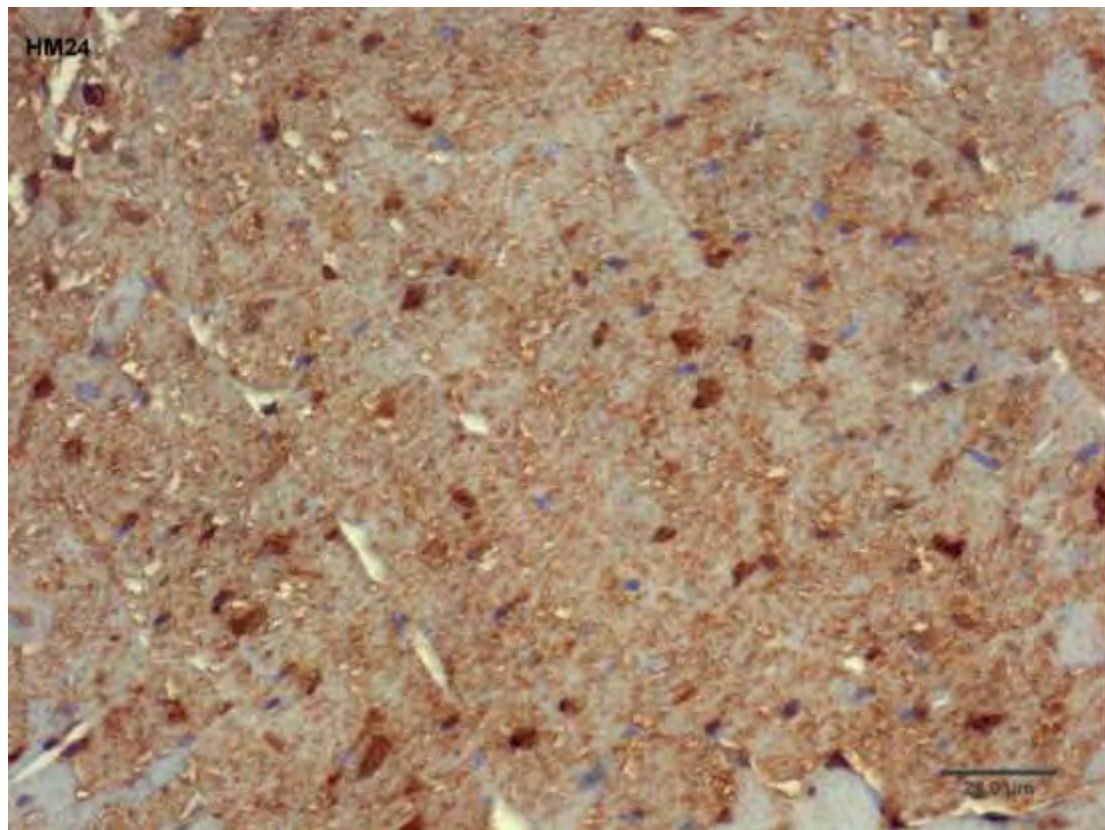
Εικόνα 44: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM17, HM18) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



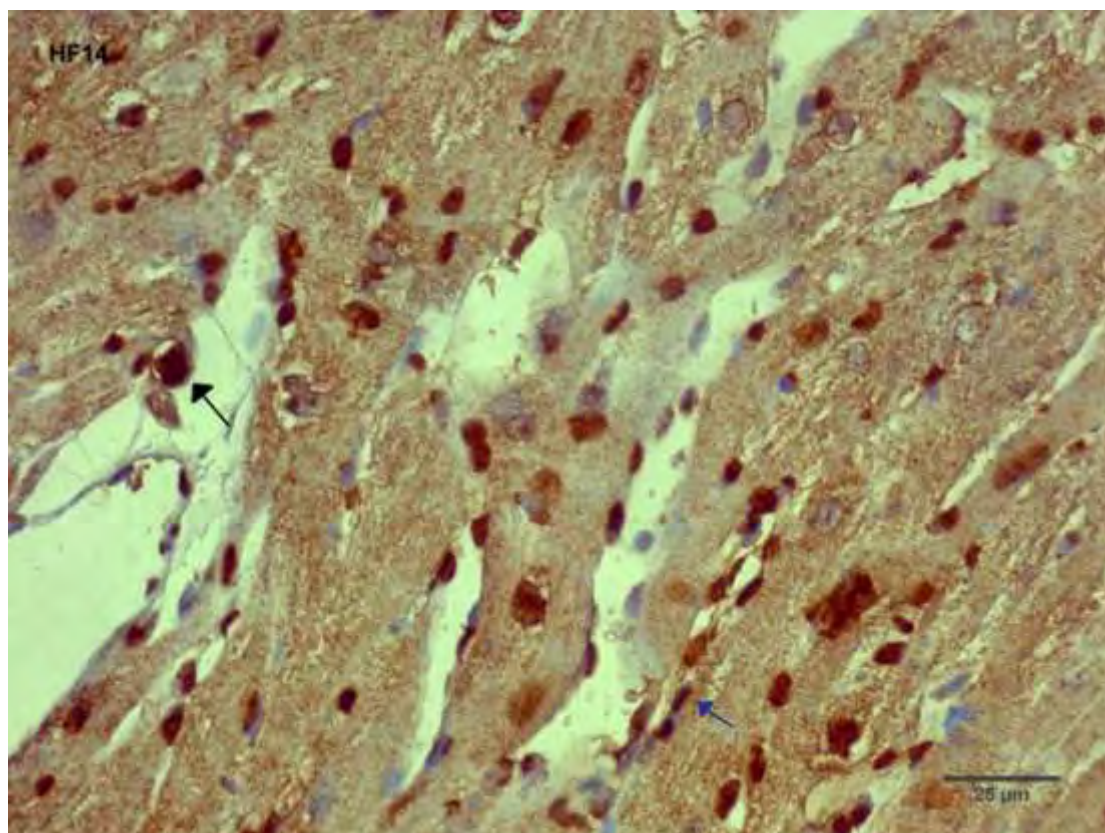
Εικόνα 45: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM19, HM20) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



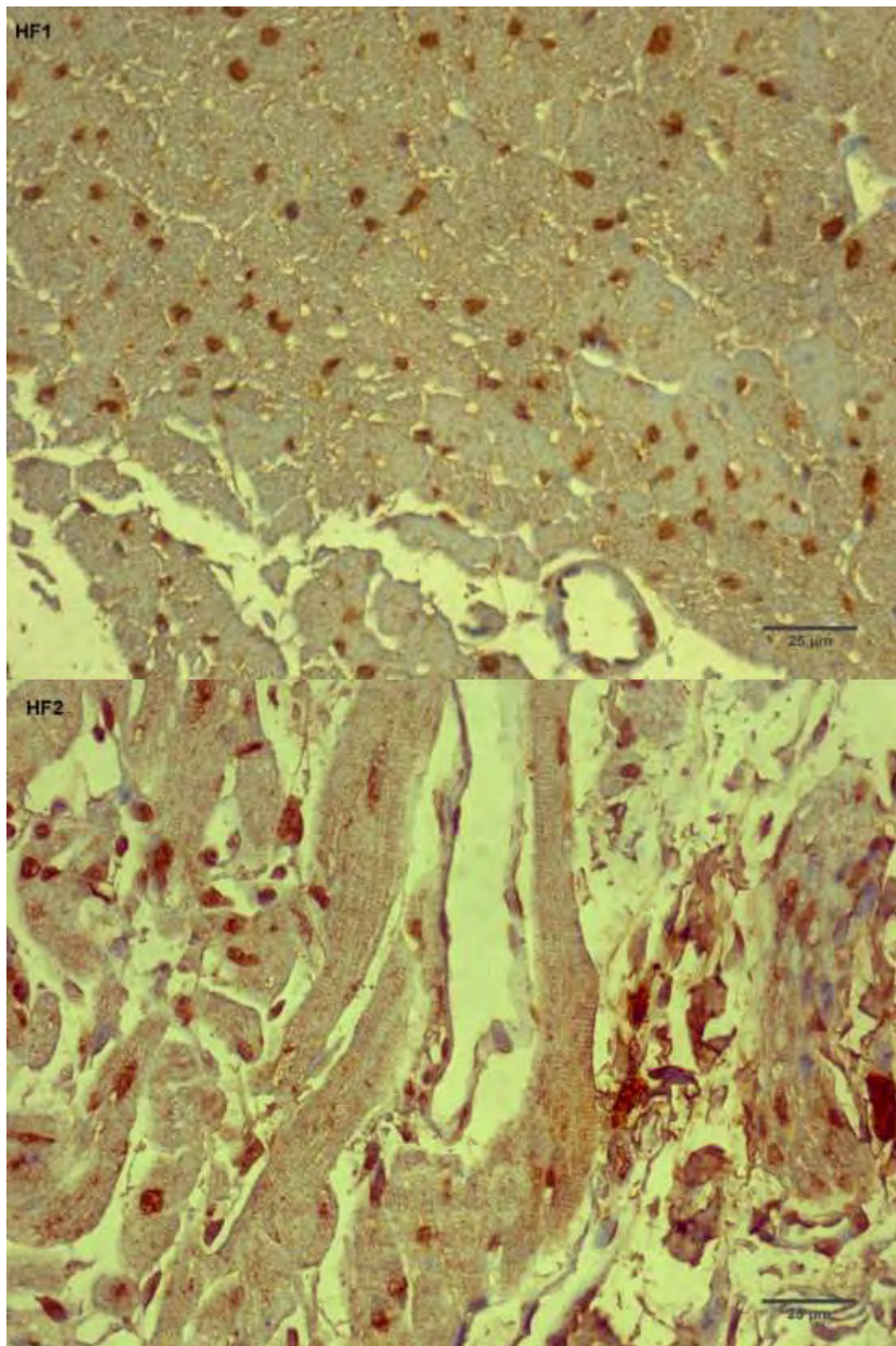
Εικόνα 46: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των αρσενικών ποντικών (HM21, HM22) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



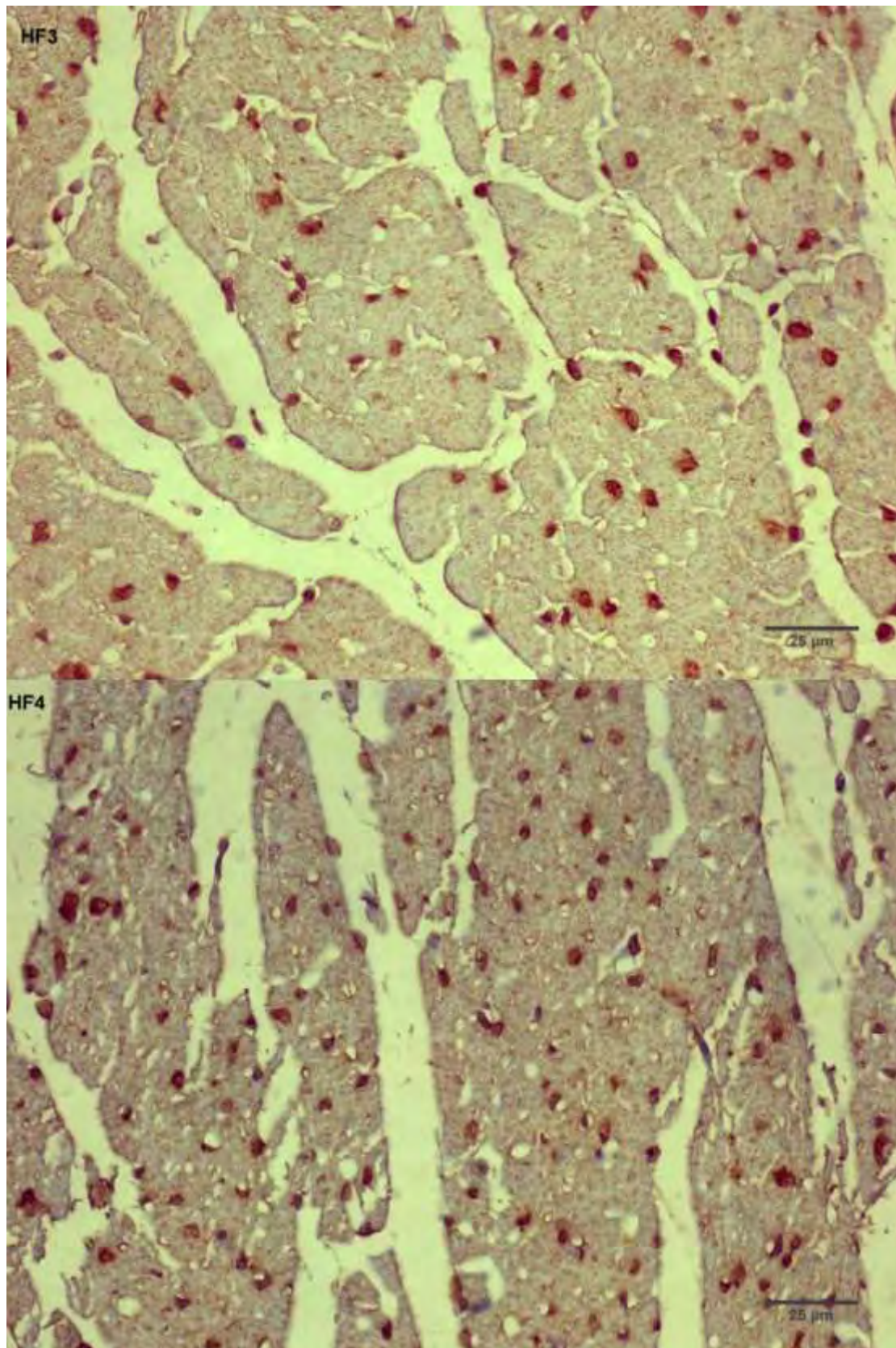
Εικόνα 47: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) του αρσενικού ποντικού (HM24) που έλαβε αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



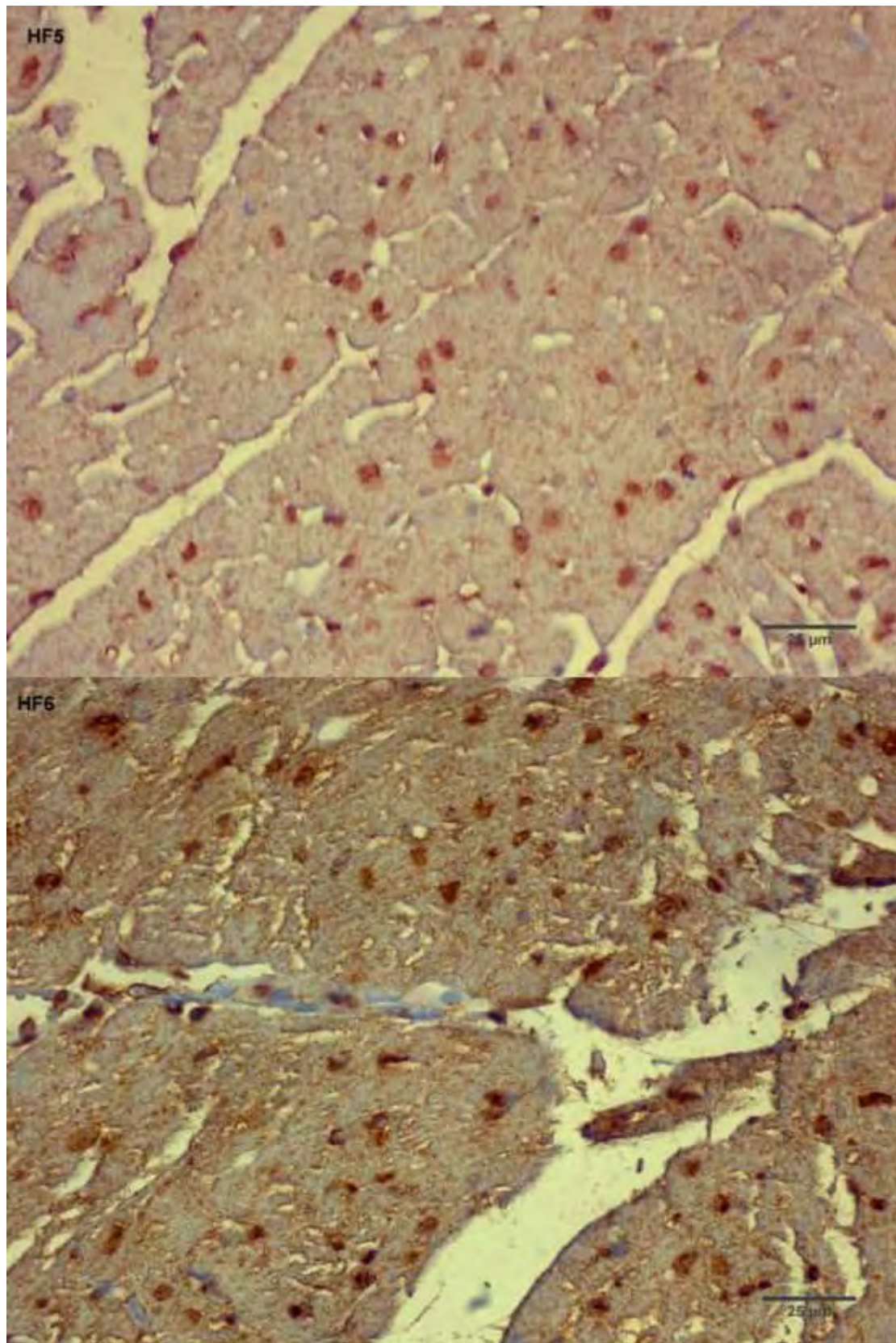
Εικόνα 48: Αθηροσκληρωτική πλάκα σε μεγέθυνση 40x. Οι πυρήνες που εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν καφέ χρώμα (μαύρο βέλος) ενώ οι πυρήνες που δεν εκφράζουν τον HIF - 1α έχουν μπλε χρώμα (μπλε βέλος)



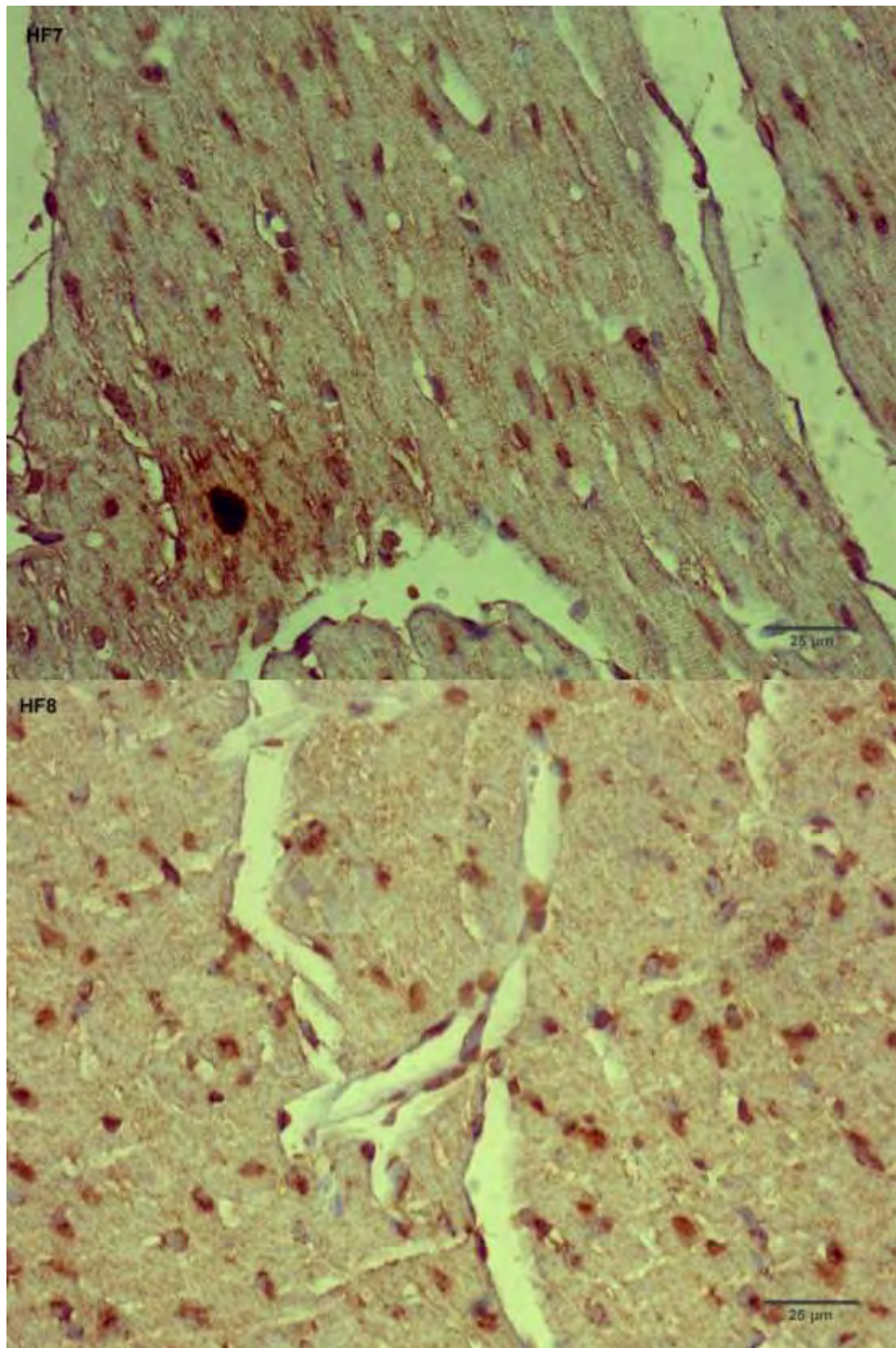
Εικόνα 49: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF1, HF2) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



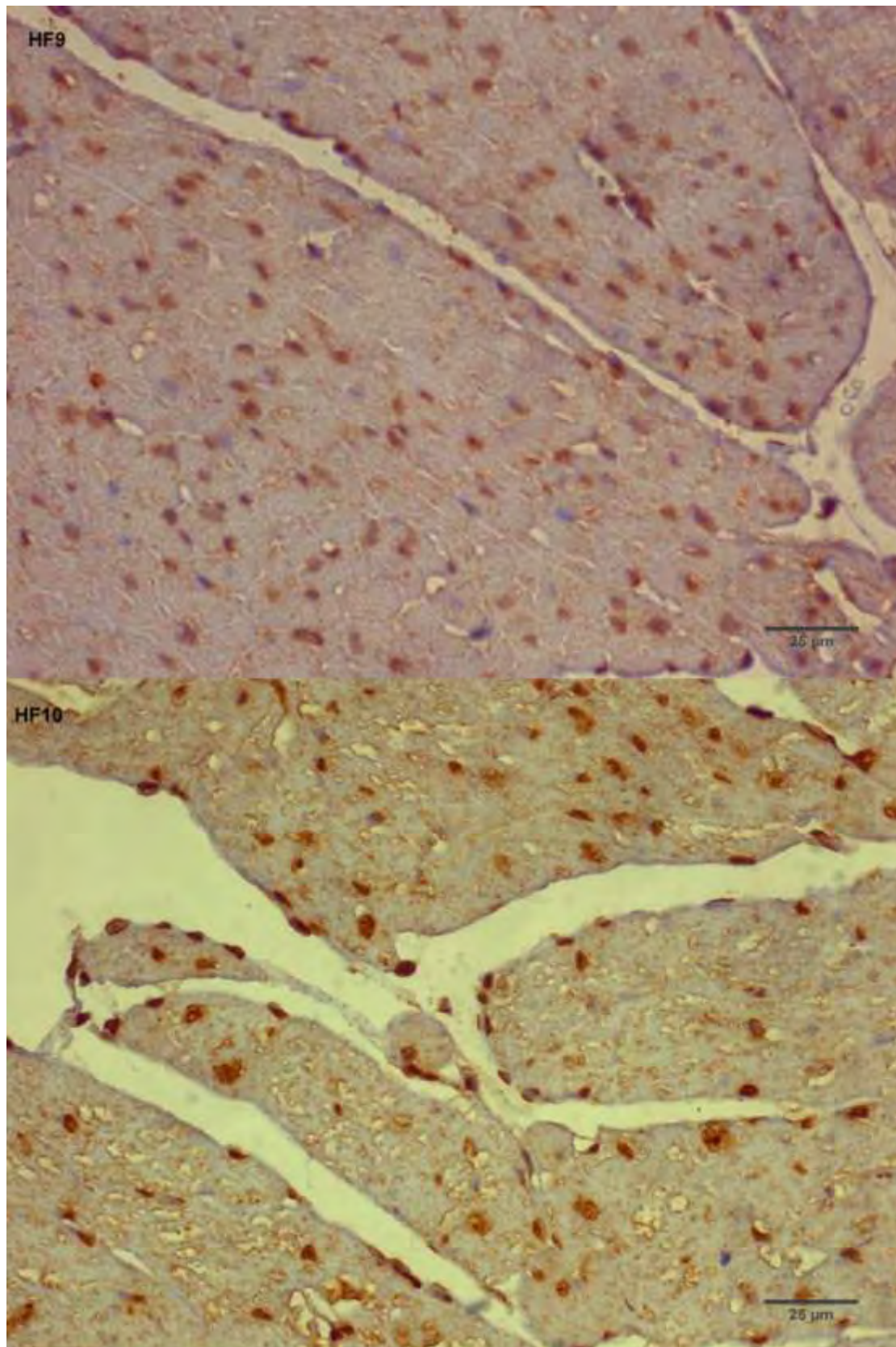
Εικόνα 50: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF3, HF4) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



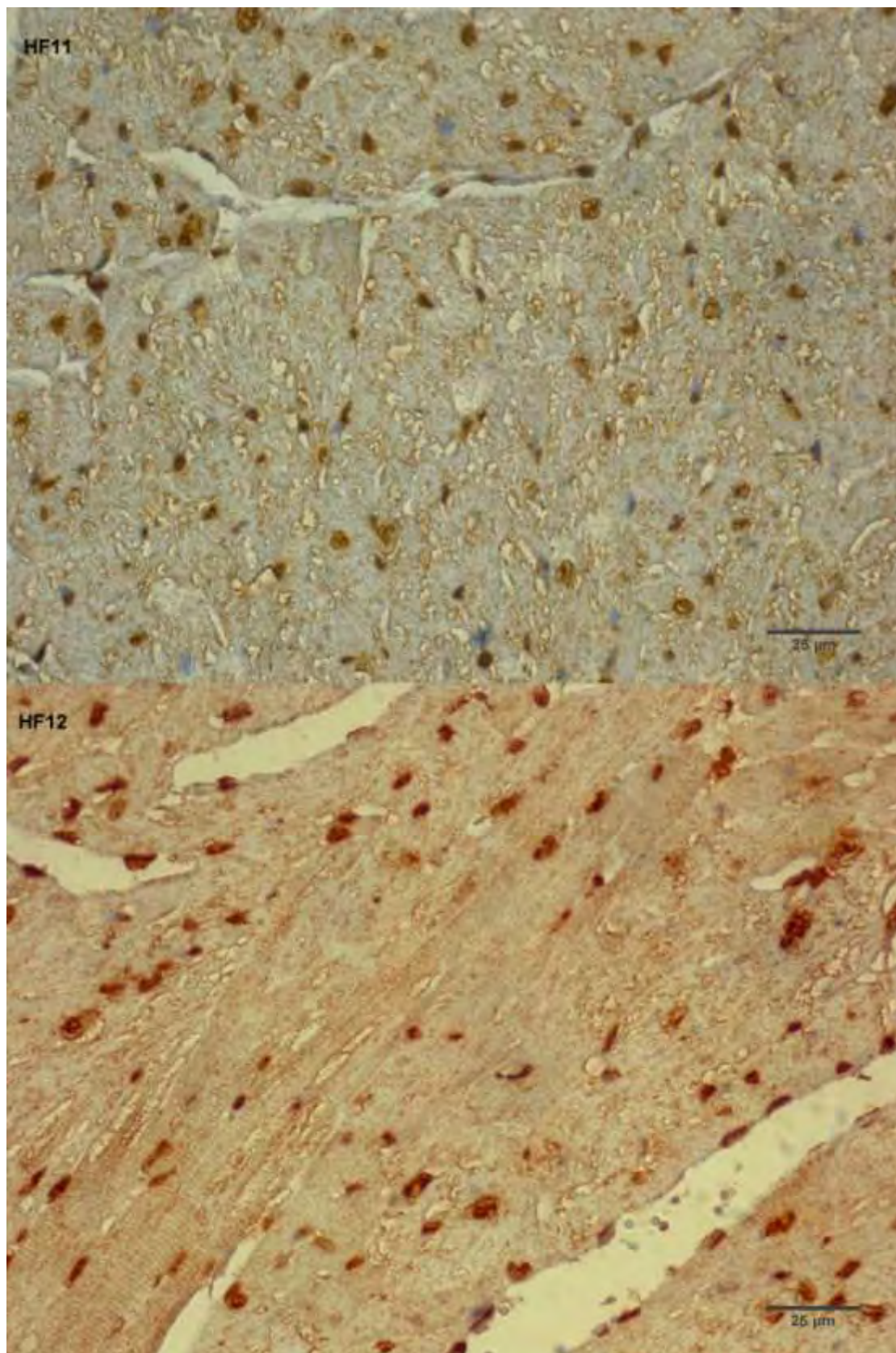
Εικόνα 51: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF5, HF6) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



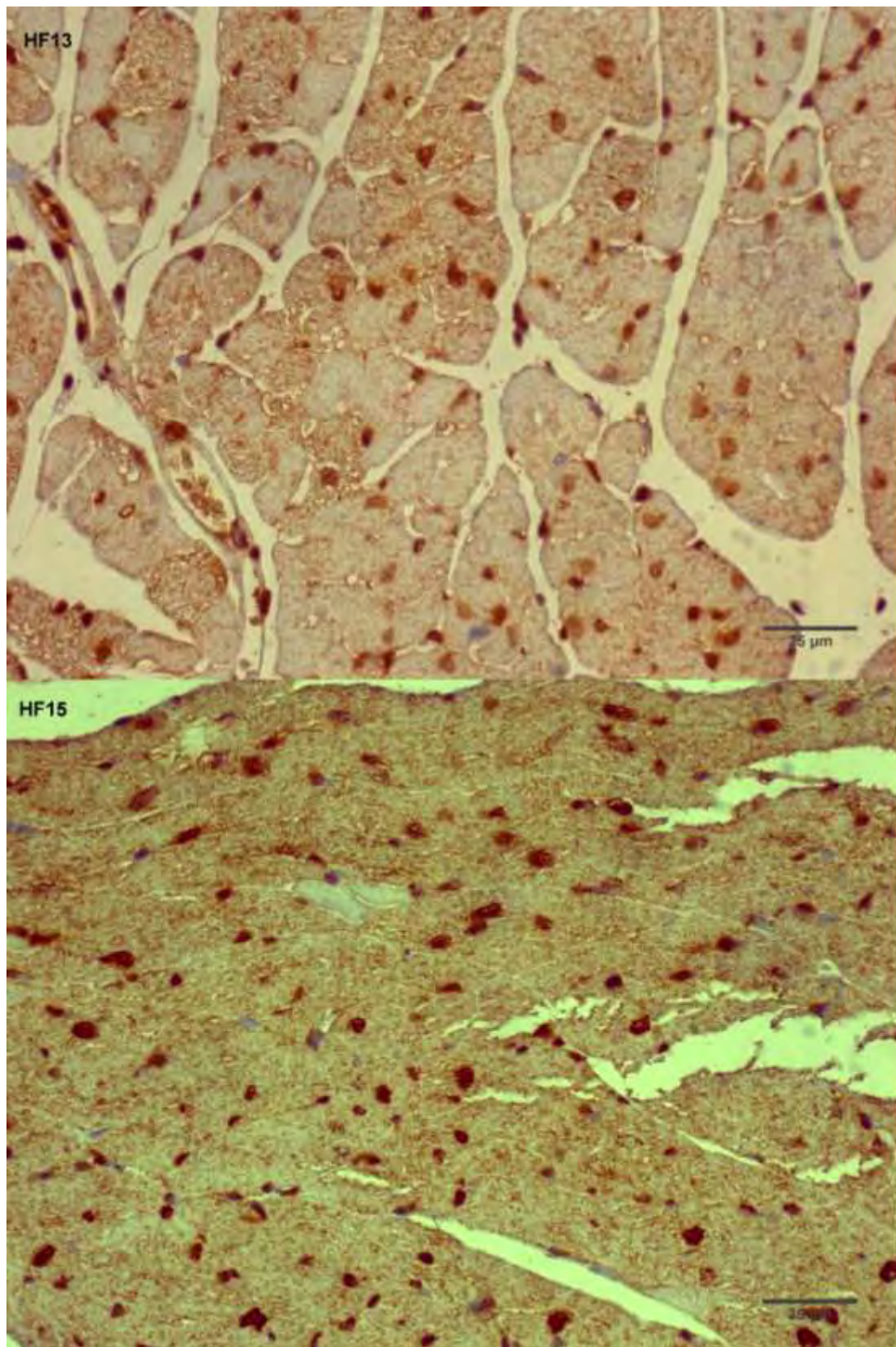
Εικόνα 52: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF7, HF8) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



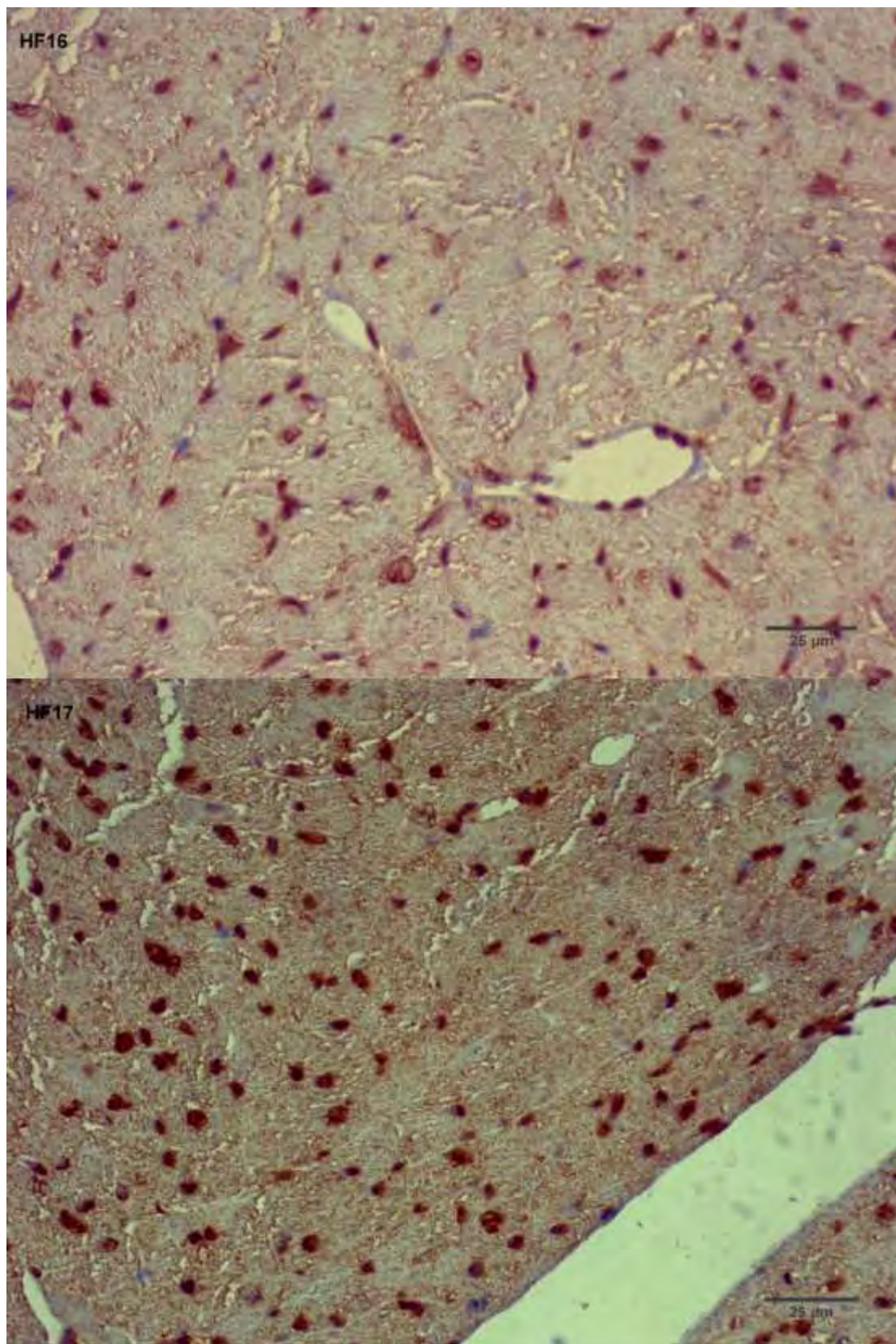
Εικόνα 53: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF9, HF10) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



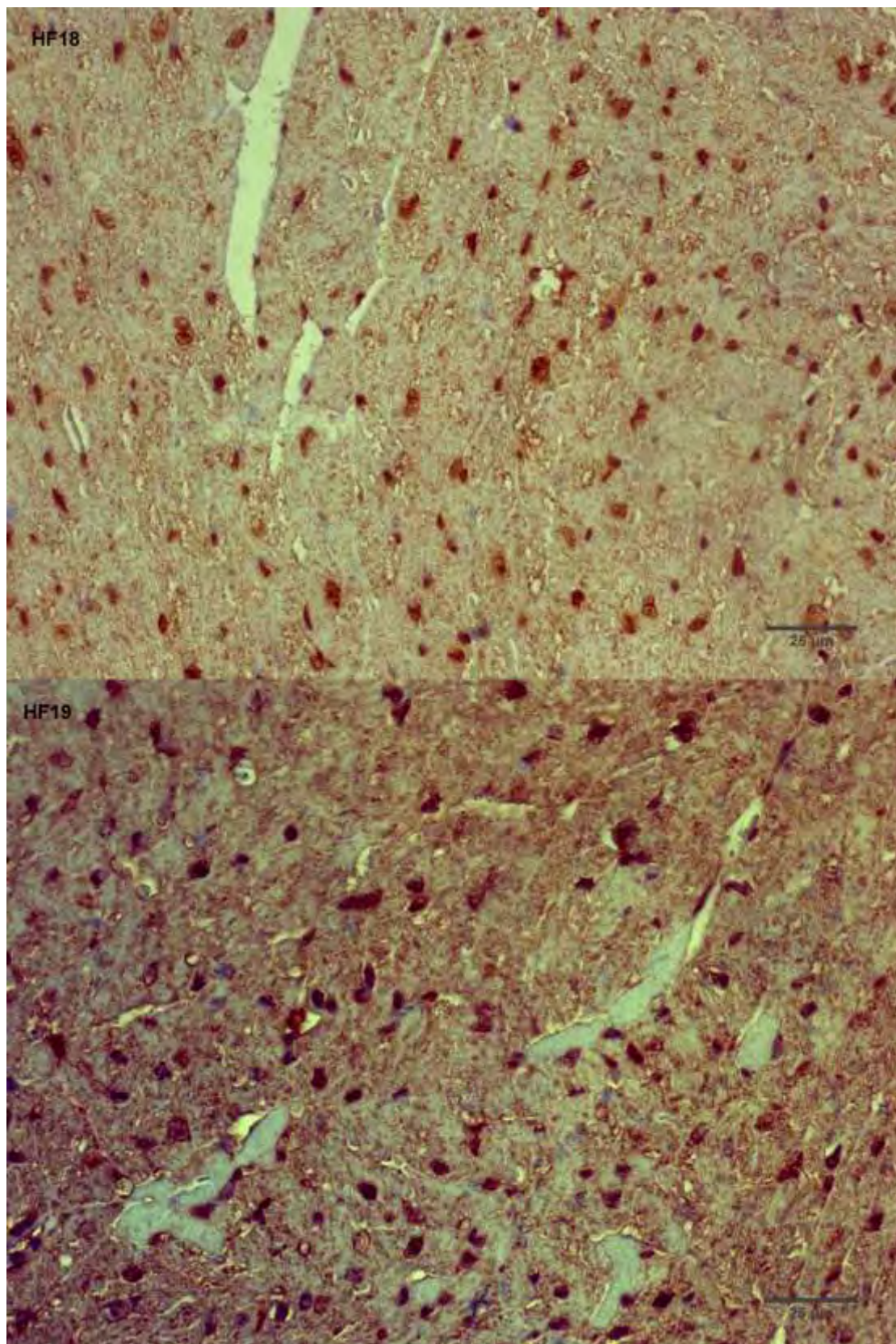
Εικόνα 54: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF11, HF12) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



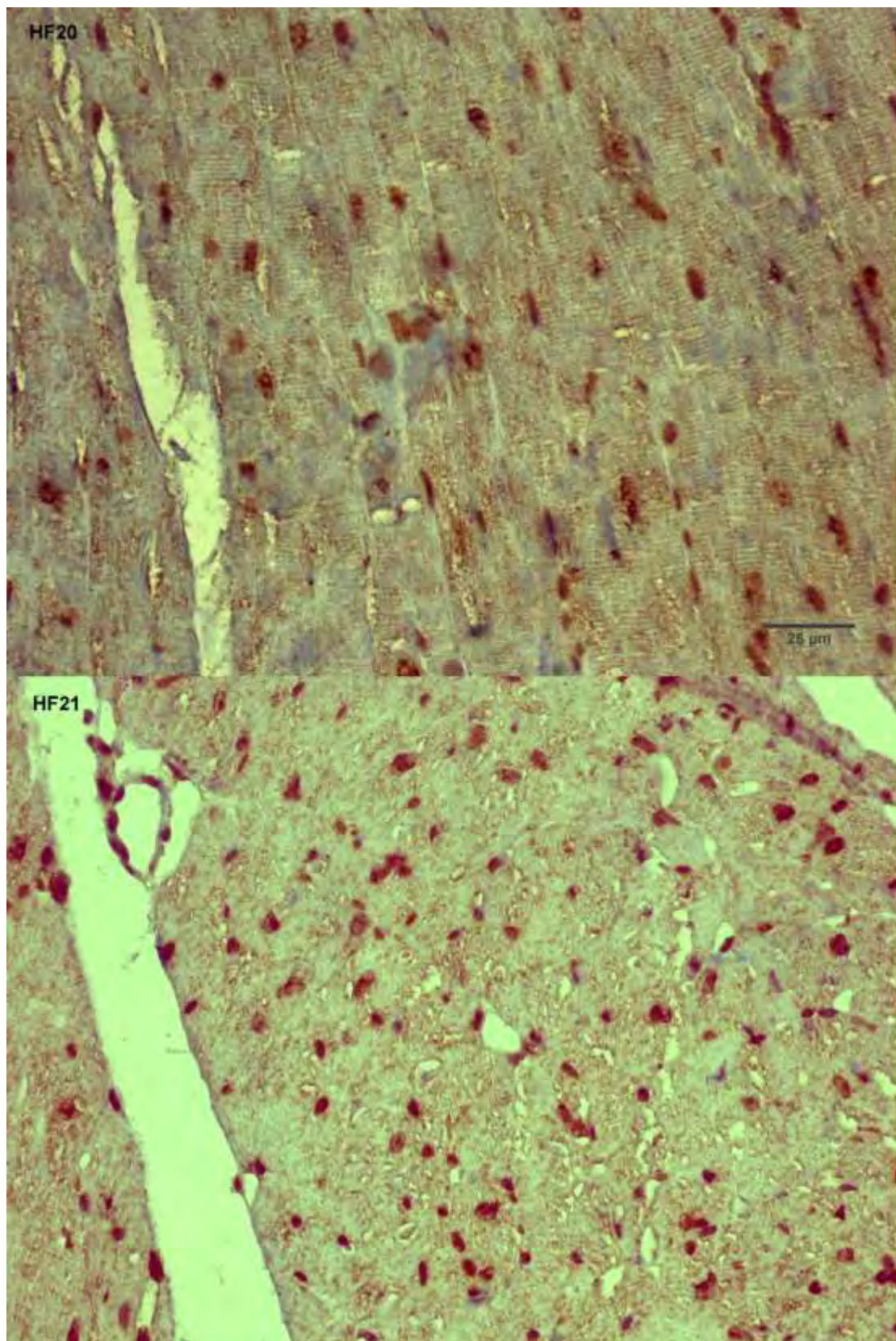
Εικόνα 55: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF13, HF15) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



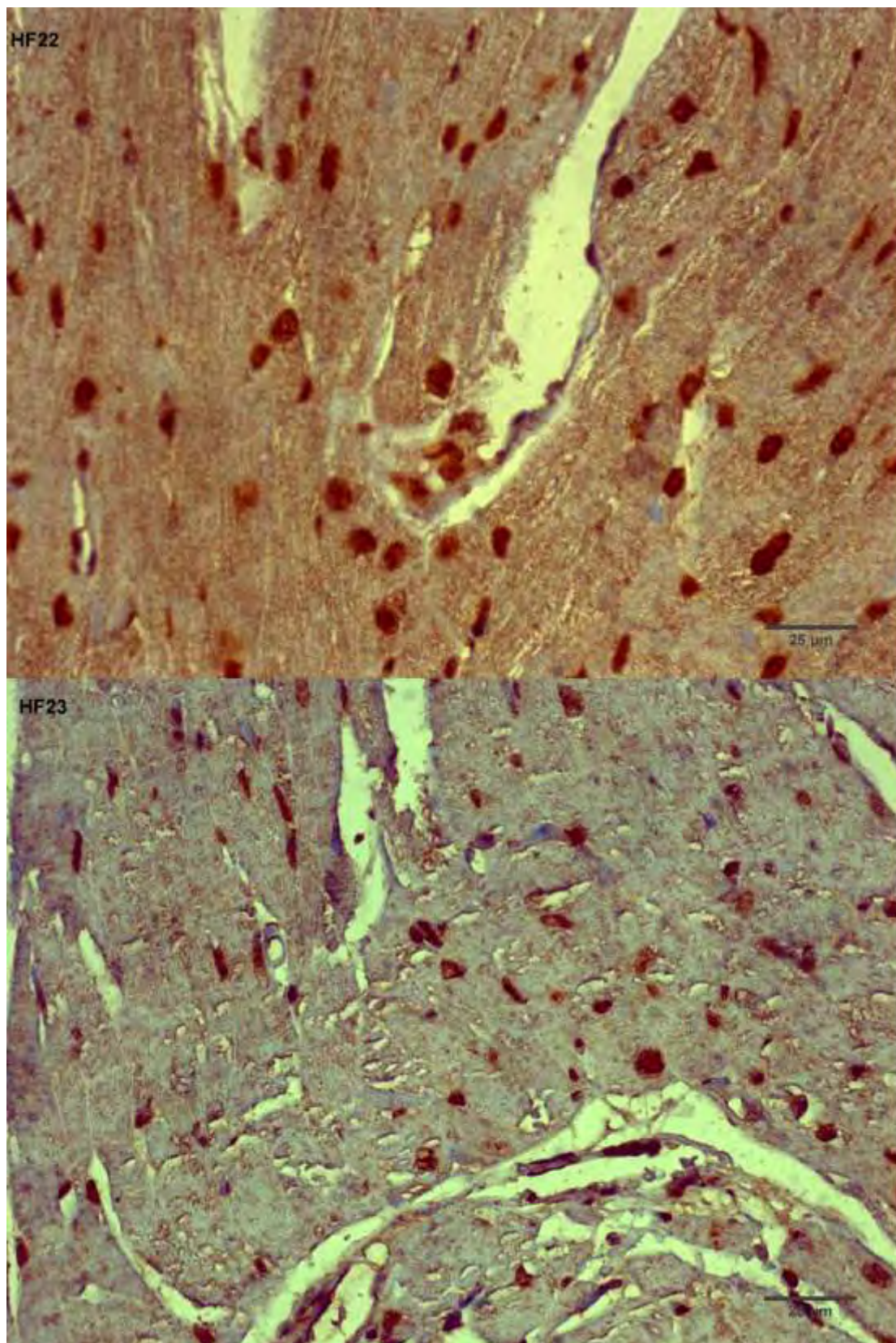
Εικόνα 56: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF16, HF17) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



Εικόνα 57: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF18, HF19) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



Εικόνα 58: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF20, HF21) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη



Εικόνα 59: Η έκφραση του HIF - 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες (μεγέθυνση 40x) των θηλυκών ποντικών (HF22, HF23) που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη

3.2 Ποσοτική έκφραση του HIF – 1α

Τα επίπεδα έκφρασης του HIF – 1α υπολογίστηκαν με βάση τον αριθμό των πυρήνων που εκφράζουν τον HIF – 1α (καφέ χρώμα) και με βάση την ένταση της αντίστοιχης χρώσης. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε ο μέσος όρος έκφρασης του HIF – 1α σε κάθε ομάδα ποντικών (CF, HF, CM, HM).

	CM	HM	CF	HF
1	150	160	160	240
2	120	210	140	150
3	160	180	160	180
4	160	240	120	210
5	140	180	120	270
6	160	240	80	180
7	140	270	150	270
8	180	180	100	160
9	160	210	95	180
10	195	160	80	240
11		270	85	270
12		270	70	240
13		270		240
14		240		270
15		240		210
16		160		240
17		180		270
18		225		285
19		255		255
20		285		240
21		285		210
22		270		240
23		285		285
24		270		

Πίνακας 2: Επίπεδα έκφρασης HIF - 1α και μέσος όρος έκφρασης του HIF - 1α ανά ομάδα ποντικών

HIF – 1α expression score	Mean	SEM	
Control Males (CM)	156,50	6,67	p=0,05
Control Females (CF)	113,33	9,50	

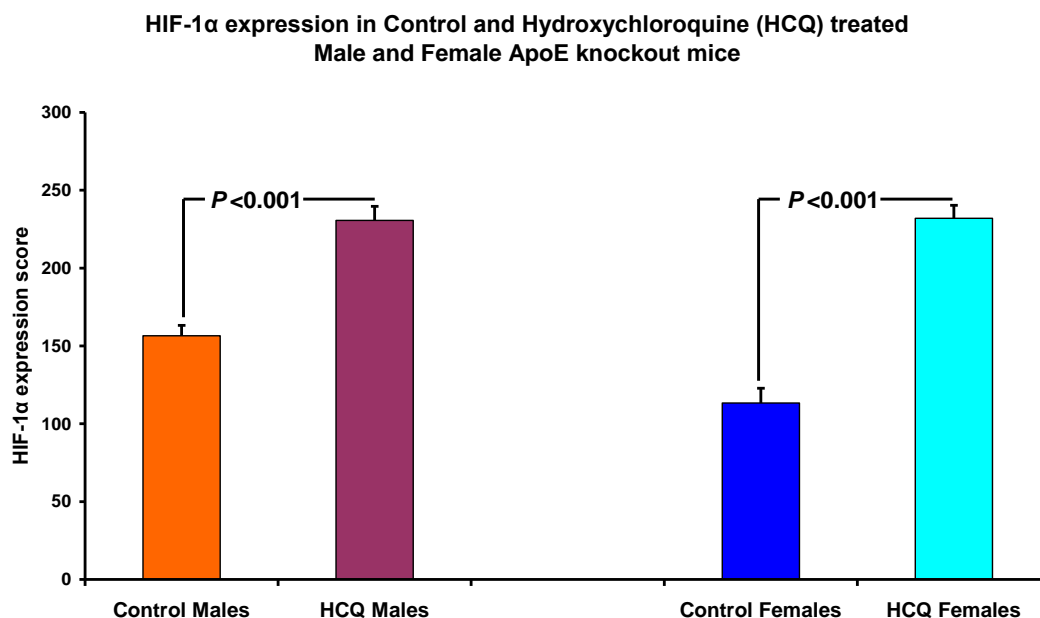
Πίνακας 3: Μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα έκφρασης HIF – 1α ανά ομάδα ποντικών μαρτύρων

Συγκρίνοντας την έκφραση του HIF – 1α στα controls αρσενικά και θηλυκά ποντίκια, διαπιστώσαμε ότι η έκφρασή του ήταν οριακά μεγαλύτερη στα αρσενικά έναντι των θηλυκών. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη έκταση της αθηροσκληρωτικής πλάκας που σε προηγούμενη μελέτη⁽⁴⁰⁾ βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη στα θηλυκά έναντι των αρσενικών ApoE knockout ποντικών.

HIF – 1α expression score	Mean	SEM	
Control Males (CM)	156,50	6,67	p<0,001
HCQ Males (HM)	230,62	9,05	
Control Females (CF)	113,33	9,50	p<0,001
HCQ Females (HF)	231,96	8,35	

Πίνακας 4: Μέση τιμή±σταθερό σφάλμα έκφρασης HIF – 1α ανά ομάδα ποντικών

Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα (Πίνακες 2, 3 & 4), παρατηρούμε ότι η έκφραση του HIF – 1α αυξάνεται σημαντικά στα ποντίκια που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη (HF, HM), σε σχέση με τα ποντίκια μάρτυρες (CF,CM), και πιο συγκεκριμένα η έκφραση του HIF – 1α είναι περίπου διπλάσια στα ποντίκια που έλαβαν υδροξυχλωροκίνη έναντι αυτών που δεν έλαβαν. Ωστόσο, τα θηλυκά ποντίκια μάρτυρες (CF) εκφράζουν σε μικρότερο ποσοστό τον HIF – 1α έναντι των αντίστοιχων αρσενικών (CM), ενώ τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά ποντίκια που έλαβαν υδροξυχλωροκίνη παρατηρείται παραπλήσια έκφραση του HIF – 1α.



Γράφημα 1: Έκφραση του HIF – 1α στις αθηροσκληρωτικές πλάκες ανά ομάδα των ApoE knockout ποντικών

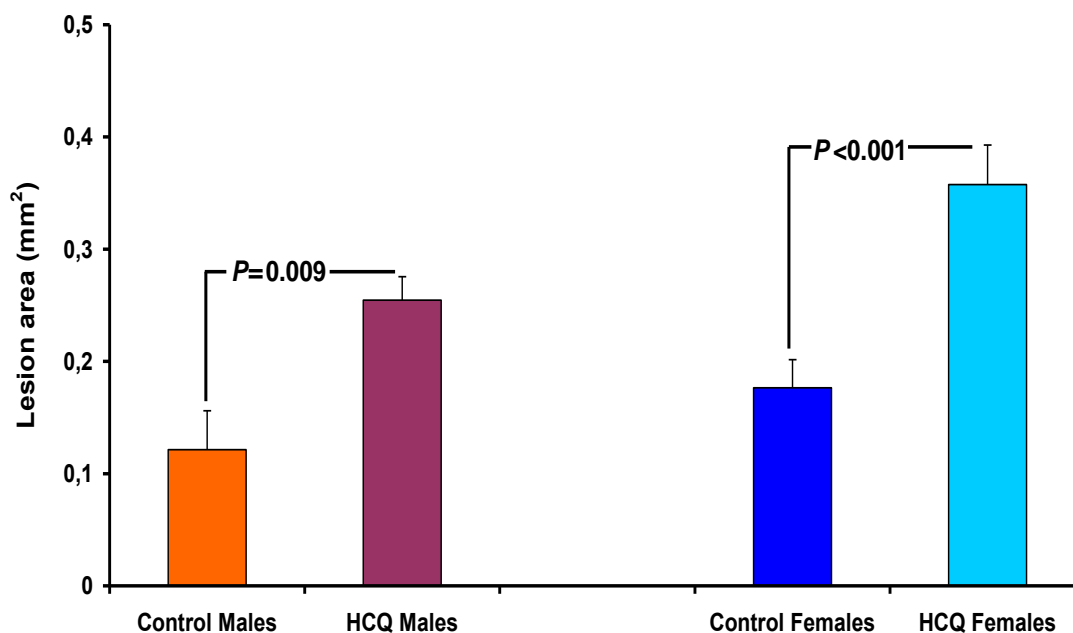
3.3 Συσχέτιση της έκφρασης του HIF - 1α με το μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας

Σε προηγούμενο πείραμα ⁽⁴⁰⁾ μετρήθηκε το μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας κάθε τομής. Οι τομές παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν σε μεγέθυνση 100x. Η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με την κάμερα Nikon DS – 5M – L1 Digital Sight Camera System και οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με το λογισμικό <<Image J for microscopy>>. Με τη χρήση του προγράμματος αυτού, υπολογίστηκε το μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας σε mm² (τετραγωνικά χιλιοστά) με βάση τον αριθμό των pixels που παρατηρούνται σε κάθε τομή (1mm = 1794 pixels, άρα 1 mm² = 3.218.486 pixels).

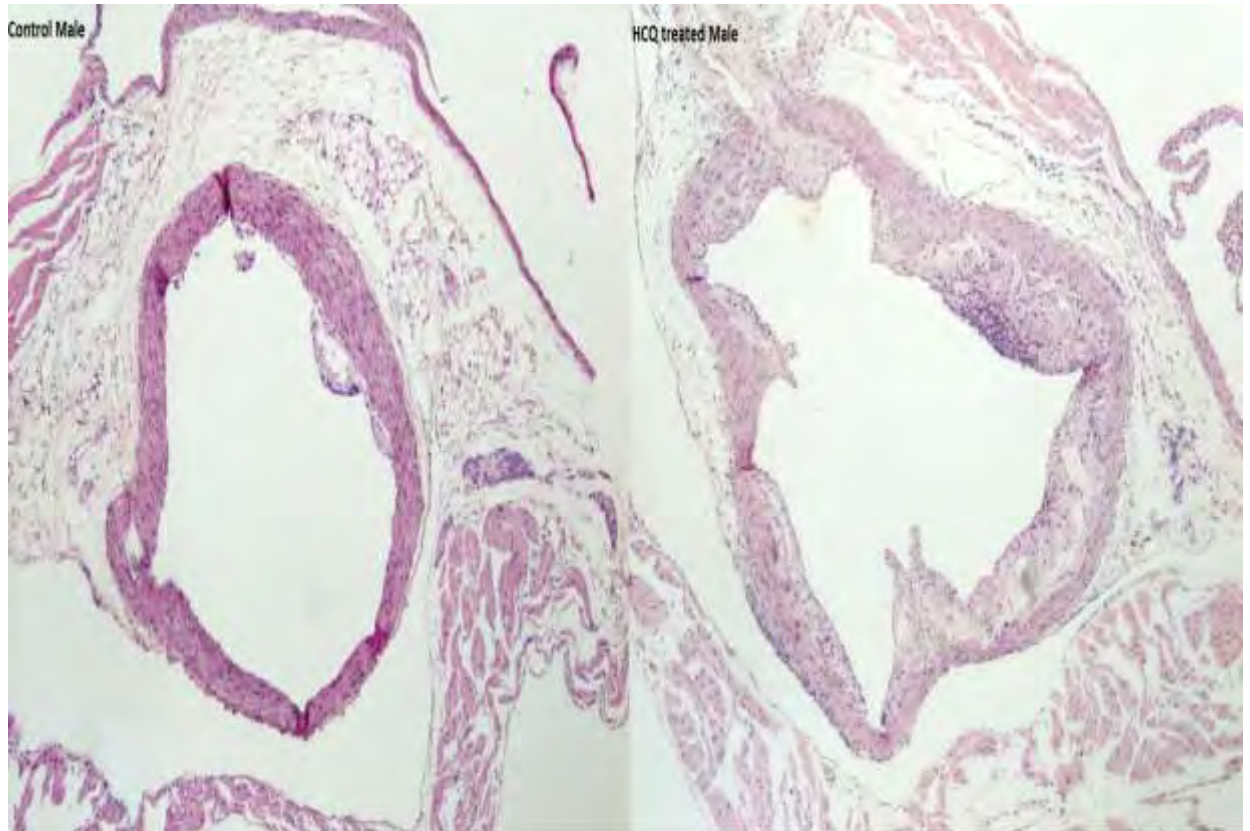
Lesion area	Mean (mm ²)	SEM	
Control Males (CM)	0,1213	0,0347	p=0,009
HCQ Males (HM)	0,2546	0,0209	
Control Females (CF)	0,1765	0,0250	p<0,001
HCQ Females (HF)	0,3576	0,0352	

Πίνακας 5: Μέση τιμή±σταθερό σφάλμα του μεγέθους της αθηροσκληρυντικής πλάκας σε mm² ανά ομάδα ποντικών ⁽⁴⁰⁾

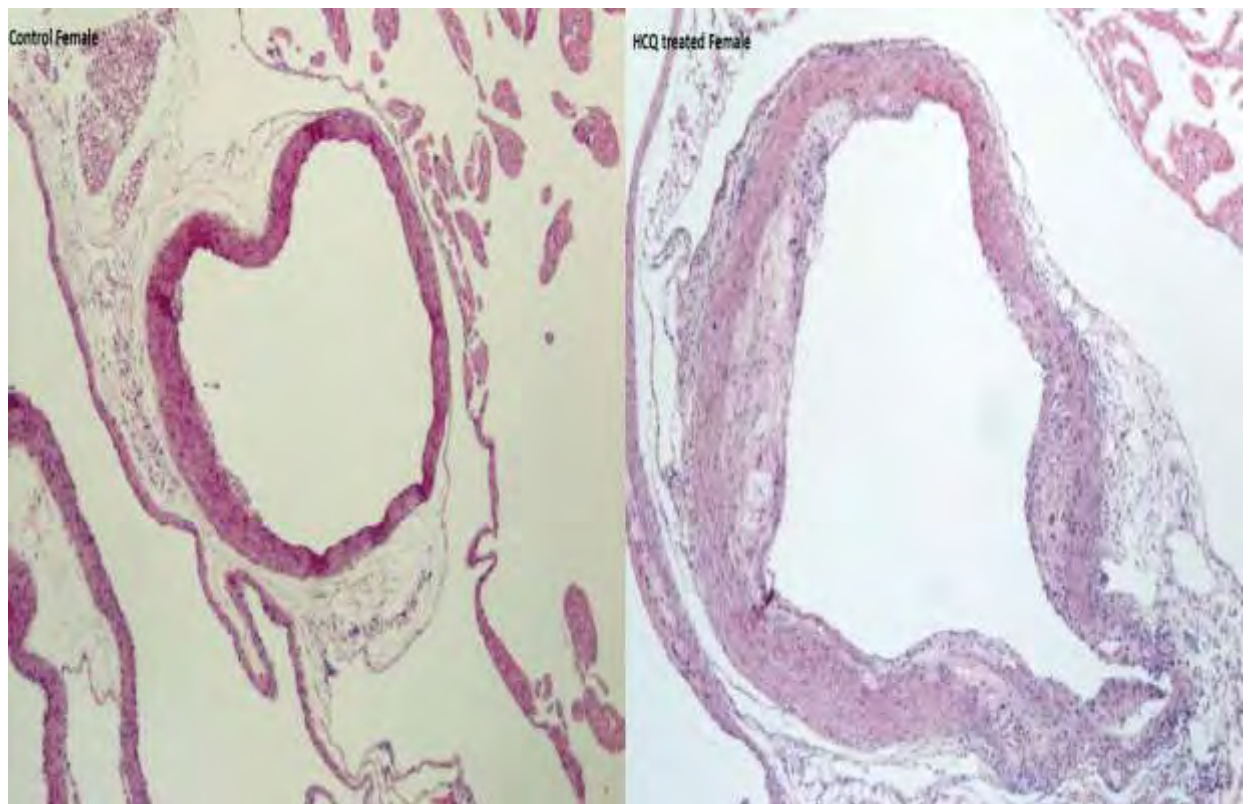
Lesion area (mm²) in Control and Hydroxychloroquine (HCQ) treated Male and Female ApoE knockout mice



Γράφημα 2: Μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας σε mm² ανά ομάδα των ApoE knockout ποντικών ⁽⁴⁰⁾



Εικόνα 60: Περιοχή αθηροσκληρυντικής πλάκας στα αρσενικά ποντίκια μάρτυρες και στα αρσενικά ποντίκια που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη⁽⁴⁰⁾



Εικόνα 61: Περιοχή αθηροσκληρυντικής πλάκας στα θηλυκά ποντίκια μάρτυρες και στα θηλυκά ποντίκια που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη⁽⁴⁰⁾

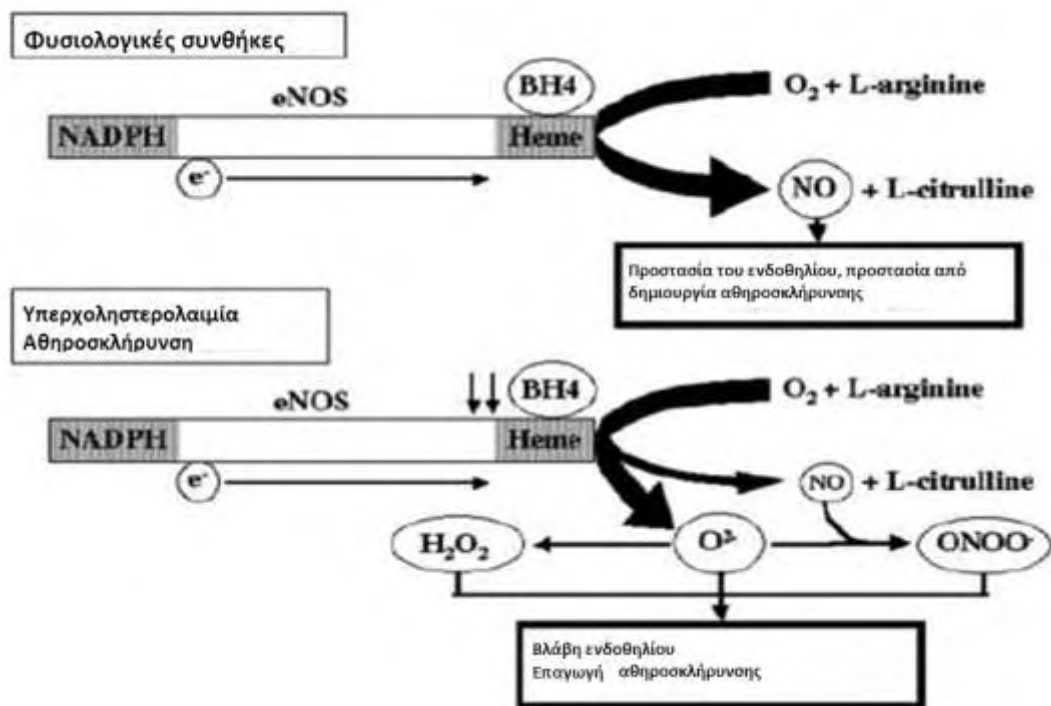
Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα φαίνεται ότι η αθηροσκληρυντική πλάκα αυξάνεται σημαντικά στα ποντίκια που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη. Οπότε συμπεραίνουμε ότι η αγωγή με υδροξυχλωροκίνη που έλαβαν τα ποντίκια επιδείνωσε σημαντικά την ήδη υπάρχουσα αθηροσκληρήνωση συγκριτικά με τα controls.

Όπως είναι αναμενόμενο, αφού ο HIF – 1α εκφράζεται στις αθηροσκληρυντικές πλάκες ⁽⁵⁾, αν αυξηθεί το μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας πρέπει να αυξηθούν και τα επίπεδα έκφρασης του HIF – 1α, κάτι το οποίο αποδεικνύεται με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 2.

3.4 Συσχέτιση της έκφρασης του HIF – 1α με την έκφραση της eNOS

3.4.1 eNOS και αθηροσκληρήνωση

Το νιτρικό οξείδιο (NO) παράγεται από τη μετατροπή της L – αργινίνης σε L – κιτρουλίνη με την καταλυτική επίδραση του NADPH εξαρτώμενου ενζύμου της συνθετάσης του NO (NOS), η δράση της οποίας εξαρτάται από την παρουσία διαφόρων συμπαραγόντων όπως είναι το Ca^{2+} , η καλμοδουλίνη, το FAD, το FMN και η τετραϋδροβιοπτερίνη (BH4) ⁽⁴³⁾. Το NO παρουσιάζει μια ποικιλία ενδοκυτταρικών επιδράσεων που έχουν ως αποτέλεσμα τη διαστολή των αγγείων, την ενδοθηλιακή αναγέννηση, την αναστολή της χημειοταξίας των λευκοκυττάρων και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Η βλάβη του ενδοθηλίου και το αυξημένο οξειδωτικό stress, που παρατηρείται στην αθηροσκληρήνωση, έχει ως συνέπεια τη μείωση της βιοδραστικότητας της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS), λόγω μείωσης των επιπέδων του συμπαραγόντα BH4, με αποτέλεσμα τη μειωμένη απελευθέρωση του NO σε συνδυασμό με την παραγωγή δραστικών ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Εικόνα 62) ⁽⁴⁴⁾.



Εικόνα 62: Ο ρόλος της eNOS στην αθηροσκλήρυνση ⁽⁴³⁾

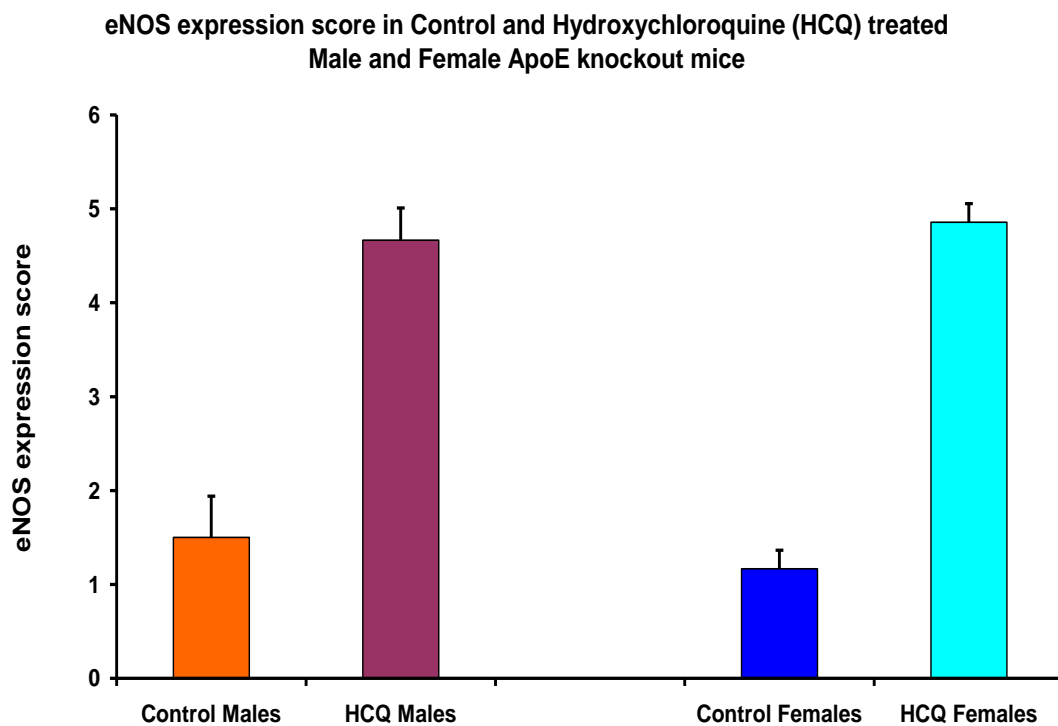
3.4.2 Έκφραση της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες ApoE knockout ποντικών

Εκτός από το μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας, υπολογίστηκαν και τα επίπεδα έκφρασης της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των ApoE knockout ποντικών με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας. Τα επίπεδα έκφρασης της eNOS υπολογίστηκαν με βάση τον αριθμό των πυρήνων που εκφράζουν την eNOS και με βάση την ένταση της αντίστοιχης χρώσης. Το ποσοστό των πυρήνων που εκφράζουν την eNOS βαθμολογήθηκαν με: 1 βαθμός για ποσοστό πυρήνων 1 – 25%, 2 βαθμοί για ποσοστό πυρήνων 26 – 50% και 3 βαθμοί για ποσοστό πυρήνων μεγαλύτερο από 50%. Η ένταση υπολογίστηκε με βάση τον τρόπο που αναφέρεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Τέλος, οι βαθμοί του ποσοστού των πυρήνων που εκφράζουν την eNOS και οι βαθμοί της έντασης, για την κάθε τομή, προστέθηκαν. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι τα εξής:

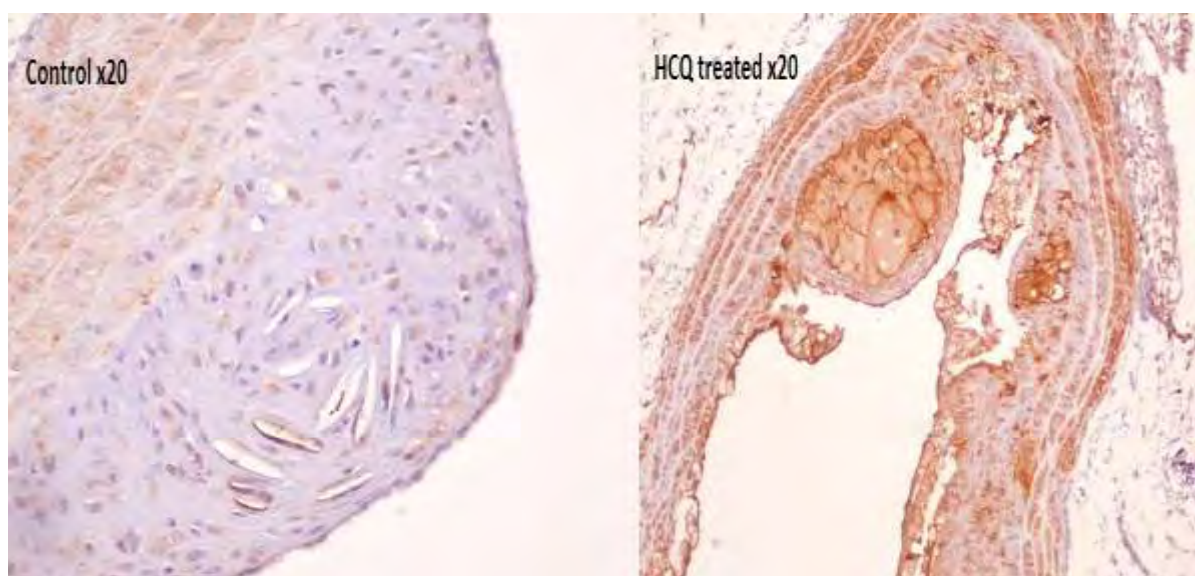
eNOS expression score	Mean	SEM	
Control Males (CM)	1,500	0,341	p<0,001
HCQ Males (HM)	4,667	0,280	
Control Females (CF)	1,167	0,440	p<0,001
HCQ Females (HF)	4,857	0,198	

Πίνακας 6: Μέση τιμή±σταθερό σφάλμα έκφρασης της eNOS ανά ομάδα ποντικών ⁽⁴⁰⁾

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα παρατηρούμε ότι, η έκφραση της eNOS αυξάνεται τόσο στα αρσενικά, όσο και στα θηλυκά ποντίκια, που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη, όπως ακριβώς και τα επίπεδα έκφρασης του HIF – 1α. Ωστόσο, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα έκφρασης της eNOS, στα ποντίκια που έλαβαν υδροξυχλωροκίνη, είναι 4 φορές μεγαλύτερα σε σύγκριση με τα ποντίκια μάρτυρες, κάτι που δεν παρατηρείται αντίστοιχα στον HIF – 1α (διπλάσια έκφραση της πρωτεΐνης στα ποντίκια που έλαβαν υδροξυχλωροκίνη σε σύγκριση με τα ποντίκια μάρτυρες).



Γράφημα 3: Έκφραση της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες ανά ομάδα των ApoE knockout ποντικών ⁽⁴⁰⁾



Εικόνα 63: Έκφραση της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των Control & HCQ treated ApoE knockout ποντικών ⁽⁴⁰⁾

4. Συζήτηση

Η αθηροσκλήρυνση αποτελεί νόσο των αρτηριών κατά την οποία το τοίχωμα σκληραίνει ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των λιποπρωτεϊνών, των κυττάρων του αίματος και του αρτηριακού τοιχώματος ⁽¹⁾. Οι κλινικές εκδηλώσεις της αθηροσκλήρυνσης είναι χαρακτηριστικές και εξαρτώνται από το αγγειακό δίκτυο που προσβάλλει. Γενικά, οι αθηροσκληρυντικές βλάβες σχηματίζονται σε σημεία διακλάδωσης των αρτηριών όπου το αίμα αποκτά στροβιλώδη ροή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τοπικοί αιμοδυναμικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εστιακή κατανομή των βλαβών. Κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι ο τρόπος με τον οποίο η αθηροσκλήρυνση προσβάλλει ένα αρτηριακό τμήμα. Συνήθως, τα αθηρώματα είναι στενωτικές βλάβες που προκαλούν περιορισμό της ροής του αίματος και αρτηριακή απόφραξη, ωστόσο η αθηροσκλήρυνση μπορεί επίσης να προκαλέσει την ανάπτυξη ανευρυσματικής νόσου, η οποία εκφράζεται με τη ρήξη της αθηροσκληρυντικής πλάκας ⁽²⁾.

Η αθηροσκλήρυνση θεωρείται μια πολυπαραγοντική νόσος, ωστόσο τέσσερις θεωρούνται οι βασικοί παράγοντες για την εξέλιξή της : η αύξηση των λιπιδίων στο αίμα, αιμοδυναμικοί και μηχανικοί παράγοντες της ροής του αίματος που καθιστούν ευάλωτο το αρτηριακό τοίχωμα, οι παράγοντες πήξης και θρόμβωσης και οι λοιμώξεις ⁽¹⁾.

Στα αρχικά στάδια, η αθηροσκλήρυνση χαρακτηρίζεται από συγκέντρωση λιπιδίων, κυρίως εστέρων χοληστερόλης και συσσώρευση μακροφάγων που προσλαμβάνουν τη χοληστερόλη και μετατρέπονται σε <<αφρώδη>> κύτταρα. Σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου παρατηρείται πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων και αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα. Το αποτέλεσμα όλων αυτών είναι ο σχηματισμός της αθηροσκληρυντικής πλάκας ⁽²⁾.

Η έρευνα για τη μελέτη της αθηροσκλήρυνσης, οδήγησε στη δημιουργία πειραματικών μοντέλων (συνήθως ζωικών). Ένα ζωικό πειραματικό μοντέλο είναι ένας οργανισμός ο οποίος πάσχει από μια ασθένεια που είναι παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται στον άνθρωπο ⁽⁷⁾. Η χρήση ζωικών οργανισμών στην έρευνα για την αθηροσκλήρυνση ξεκίνησε πριν περίπου έναν αιώνα και θεωρείται πλέον απαραίτητη. Τα ApoE knockout ποντίκια αποτελούν ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ζωικά μοντέλα στη μελέτη της αθηροσκλήρυνσης ⁽⁸⁾. Τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν αθηροσκλήρυνση αυτόματα ενώ επίσης παρατηρείται όλο το φάσμα των αλλοιώσεων κατά τη διάρκεια ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης, το οποίο είναι παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται στον άνθρωπο ⁽¹⁴⁾.

Στην παρούσα εργασία, χορηγήθηκε υδροξυχλωροκίνη σε ApoE knockout ποντίκια για 16 εβδομάδες, με στόχο τον προσδιορισμό των επιπέδων του παράγοντα που επάγεται από την υποξία, HIF – 1α. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του HIF – 1α συσχετίστηκαν με το μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας και τα επίπεδα της έκφρασης της ενδοθηλιακής συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου eNOS, τα οποία είχαν προσδιοριστεί σε προηγούμενη μελέτη ⁽⁴⁰⁾.

Η υδροξυχλωροκίνη είναι ένα ανθελονοσιακό φάρμακο, που χρησιμοποιείται και για τη θεραπεία ορισμένων αυτοάνοσων νοσημάτων. Ένα κύριο χαρακτηριστικό των ασθενών αυτών είναι η ανάπτυξη αθηροσκληρυνσης πιο συχνά σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. Συνήθως, η ανάπτυξη αθηροσκληρυνσης είναι συνέπεια της χρόνιας συστηματικής φλεγμονής και της θεραπείας με στεροειδή φάρμακα, τα οποία πιστεύεται ότι είναι αθηρογόνα λόγω της επίδρασής τους στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος ⁽¹⁹⁾.

Η επίδραση της υδροξυχλωροκίνης στην ανάπτυξη και την πρόοδο της αθηροσκληρυνσης σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας διαφόρων ερευνητικών ομάδων. Από τις μέχρι τώρα κλινικές μελέτες, φαίνεται ότι η χορήγηση υδροξυχλωροκίνης στους ασθενείς αυτούς μπορεί να μειώσει την LDL χοληστερόλη καθώς και την παραγωγή τριγλυκεριδίων με συνέπεια τη μειωμένη ανάπτυξη αθηροσκληρυνσης ⁽²⁰⁾. Επιπλέον, σε πρόσφατες μελέτες αναφέρεται ότι η υδροξυχλωροκίνη βελτιώνει τα επίπεδα των λιπιδίων στο αίμα των ασθενών, ενώ επίσης η χρήση της συνδέεται με το σχηματισμό μικρότερου ποσοστού αθηρωματικής πλάκας στις αρτηρίες ⁽⁴⁵⁾. Τέλος, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια αποδείχθηκε ότι η υδροξυχλωροκίνη μπορεί να αντιστρέψει τη θρομβογένεση που προκαλείται από τα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα στα ποντίκια ⁽²¹⁾.

Εβδομήντα ApoE knockout ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, από τα οποία 24 αρσενικά και 24 θηλυκά έλαβαν υδροξυχλωροκίνη στο πόσιμο νερό σε δόση 100 mg/kg σωματικού βάρους και 10 αρσενικά και 12 θηλυκά ποντίκια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (controls). Η χορήγηση της υδροξυχλωροκίνης ξεκίνησε σε ηλικία 16 εβδομάδων και η θεραπεία διήρκεσε για 16 εβδομάδες.

Η μέτρηση της αθηροσκληρυντικής πλάκας των ποντικών αυτών, μετά το τέλος της θεραπείας με υδροξυχλωροκίνη έδειξε σημαντική αύξηση του μεγέθους της πλάκας στα ποντίκια που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη συγκριτικά με τα ποντίκια μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα το μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας των ποντικών που έλαβαν υδροξυχλωροκίνη ήταν σχεδόν διπλάσιο σε σχέση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν υδροξυχλωροκίνη. Συμπερασματικά, η αγωγή με υδροξυχλωροκίνη σε δόση 100mg/kg σωματικού βάρους σε ApoE knockout ποντίκια επιδείνωσε σημαντικά τις αθηροσκληρυντικές βλάβες.

Η πρωτεΐνη HIF – 1α, έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές διεργασίες, όπως είναι η ανάπτυξη ισχαιμικών καρδιαγγειακών συμβαμάτων, η πνευμονική υπέρταση, διαταραχές κατά τη κύηση και η ανάπτυξη καρκίνου ⁽²⁹⁾. Επιπλέον όπως είναι γνωστό, τα αφρώδη κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία της αθηροσκληρυνσης, προέρχονται από τη φαγοκυττάρωση της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης από τα μακροφάγα ⁽¹⁾. Τα μακροφάγα έχουν την τάση να εντοπίζονται και να παραμένουν σε υποξικές περιοχές των αθηροσκληρυντικών πλακών. Κατά την ανάπτυξη της αθηροσκληρυντικής βλάβης, η υποξία επιδεινώνεται τόσο από τη συνεχόμενη πάχυνση του αρτηριακού τοιχώματος, όσο και από τη συνεχόμενη ζήτηση οξυγόνου από τα μακροφάγα ⁽³⁵⁾. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι στις αθηροσκληρυντικές πλάκες αναπτύσσονται νέα αγγεία, με τη διαδικασία της νεοαγγειογένεσης, η οποία σχετίζεται με την πρόοδο ανάπτυξης της πλάκας. Η νεοαγγειογένεση είναι μια σημαντική συνέπεια της υποξίας σε

διάφορους ιστούς, οπότε η δημιουργία νέων αγγείων σε αθηροσκληρυντικές πλάκες, υποδηλώνει την ύπαρξη υποξίας. Ένα υποξικό κύτταρο, κατά κανόνα ενεργοποιεί τον HIF – 1α. Δηλαδή, ο HIF – 1α εκφράζεται <<φυσιολογικά>> στην περιοχή της αθηροσκληρυντικής πλάκας. Ως εκ των ανωτέρω, διερευνήθηκε η έκφραση του HIF – 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των ApoE knockout ποντικών που είχαν λάβει υδροξυχλωροκίνη έναντι των controls .

Η έκφραση του HIF – 1α στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των ApoE knockout ποντικών μελετήθηκε με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας. Τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα αυτού προσδιορίστηκαν με βάση την ένταση και την έκταση της χρώσης. Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του HIF – 1α χρησιμοποιήθηκε το “Quick score”, δηλαδή το γινόμενο των πυρήνων που εκφράζουν τον HIF – 1α στην αθηροσκληρυντική πλάκα επί την ένταση της χρώσης.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι ο HIF – 1α εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των ποντικών που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη έναντι των ποντικών μαρτύρων και μάλιστα το ποσοστό έκφρασης είναι περίπου διπλάσιο στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα που αφορούν στο μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας, καθόσον στα ποντίκια όπου παρατηρείται αύξηση του μεγέθους της πλάκας είναι αναμενόμενο να αυξάνεται και το επίπεδο έκφρασης του HIF – 1α. Ωστόσο, η παρατηρηθείσα διαφορά στην έκφραση του HIF – 1α στις πλάκες μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών ποντικών μαρτύρων μπορεί να οφείλεται σε φυλοεξαρτώμενη έκφραση του HIF – 1α στα ApoE knockout ποντίκια, ανάλογη με τη διαφορά στην έκφραση της eNOS.

Η υπερέκφραση του HIF – 1α, όπως έχει αναφερθεί μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως διαγνωστικός δείκτης, αφού σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα καρδιάς ασθενών μελετήθηκε με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας η έκφραση του HIF – 1α ώστε να προσδιοριστεί η συσχέτιση του παράγοντα αυτού με την ισχαιμία και το έμφραγμα του μυοκαρδίου, λόγω αθηροσκλήρυνσης των στεφανιαίων αγγείων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η έκφραση του HIF – 1α δεν είναι σημαντική στα φυσιολογικά καρδιακά κύτταρα ενώ η έκφρασή του αυξάνεται σημαντικά μέσα σε 2 ώρες μετά από την εμφάνιση του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Έτσι ο HIF – 1α θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης του εμφράγματος του μυοκαρδίου ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ασυμπτωματικών ασθενών⁽³⁸⁾.

Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης του HIF – 1α συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των ApoE knockout ποντικών. Είναι γνωστόν ότι η βλάβη του ενδοθηλίου και το αυξημένο οξειδωτικό stress, που παρατηρείται στην αθηροσκλήρυνση, οδηγεί σε υπερέκφραση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS), με συνέπεια τη μείωση της βιοδραστικότητας της λόγω μείωσης των επιπέδων του συμπαράγοντά της, BH4 (τετραϋδροβιοπτερίνη), με τελικό αποτέλεσμα τη μειωμένη απελευθέρωση του NO σε συνδυασμό με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου⁽⁴⁴⁾.

Τα επίπεδα έκφρασης της eNOS μελετήθηκαν με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση της eNOS αυξήθηκε σημαντικά στις

αθηροσκληρυντικές πλάκες των ApoE knockout ποντικών που έλαβαν υδροξυχλωροκίνη έναντι των μαρτύρων. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση της eNOS αυξήθηκε κατά τρεις φορές στα αρσενικά ποντίκια που έλαβαν υδροξυχλωροκίνη σε σύγκριση με τα ποντίκια μάρτυρες, ενώ στα θηλυκά ποντίκια που έλαβαν υδροξυχλωροκίνη παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της eNOS τετραπλάσια έναντι των μαρτύρων. Δηλαδή, η χορήγηση υδροξυχλωροκίνης είχε ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση της eNOS. Επιπλέον, διαπιστώθηκε παρόμοια διαφορά έκφρασης ανάμεσα στα δύο φύλα. Αυτό το εύρημα ενισχύει την άποψη ότι πιθανώς η δράση της υδροξυχλωροκίνης να είναι φυλοεξαρτώμενη. Τα ανωτέρω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση της eNOS λόγω μείωσης της BH4 και η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και υπεροξειδίου είναι ίσως ένας από τους πιθανούς υποκείμενους μηχανισμούς για την επιδείνωση της αθηροσκληρυντικής βλάβης που διαπιστώθηκε στα ποντίκια που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη. Επιπροσθέτως, τα ευρήματά μας συμφωνούν με μελέτη ⁽⁴⁶⁾, όπου παρόμοια αύξηση της αθηροσκληρυντικής βλάβης διαπιστώθηκε σε ApoE knockout διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία είχε υπερέκφραστεί η eNOS.

Η παρούσα διπλωματική εργασία έδειξε ότι η χορήγηση υδροξυχλωροκίνης σε δόση 100mg/kg σε ApoE knockout ποντίκια προκαλεί επιδείνωση της αθηροσκλήρυνσης. Αυτό έχει ως συνέπεια να αυξηθεί το επίπεδο έκφρασης διαφόρων παραγόντων που <<φυσιολογικά>> εκφράζονται στην περιοχή της αθηροσκληρυντικής πλάκας, όπως είναι ο HIF – 1α ή πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία εξέλιξης της νόσου όπως είναι η eNOS. Επιπλέον, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν τόσο στο μέγεθος της αθηροσκληρυντικής πλάκας, όσο και στα επίπεδα έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών ανάμεσα στα δύο φύλα, υποδηλώνουν ότι η δράση της υδροξυχλωροκίνης μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το φύλο. Επιπλέον, η υπερέκφραση της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες των ApoE knockout ποντικών που έλαβαν αγωγή με υδροξυχλωροκίνη λόγω μείωσης της BH4 με συνέπεια την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και υπεροξειδίου είναι ενδεχομένως ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς που εξηγεί την επιδείνωση της αθηροσκλήρυνσης στα ποντίκια που έλαβαν αγωγή.

Επιβεβαίωση της ανωτέρω υπόθεσης θα αποτελούσε μελέτη στην οποία η ταυτόχρονη χορήγηση BH4 με υδροξυχλωροκίνη στην ανωτέρω δόση των 100mg/kg θα απέτρεπε την επιδείνωση της αθηροσκλήρυνσης και την υπερέκφραση της eNOS στις αθηροσκληρυντικές πλάκες. Επιπλέον απαιτούνται περαιτέρω πειράματα με χορήγηση μικρότερης δόσης υδροξυχλωροκίνης, ώστε να διερευνηθεί, αν παρόμοια επιδείνωση της αθηροσκλήρυνσης διαπιστωθεί με χαμηλότερη (10mg/kg ή 50mg/kg) δόση του φαρμάκου.

Συντομογραφίες

ApoE	<i>Apolipoprotein E</i> (απολιποπρωτεΐνη E)
BH4	<i>Tetrahydrobiopterin</i> (τετραϋδροβιοπτερίνη)
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i> (δομή έλικα – θηλιά – έλικα)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
eNOS	<i>Endothelial Nitric oxide synthase</i> (συνθετάση του νιτρικού οξειδίου)
FAD	<i>Flavin mononucleotide</i> (φλαβινο – αδενο – δινουκλεοτίδιο σε οξειδωμένη μορφή)
FMN	<i>Flavin mononucleotide</i> (φλαβινο – μονονουκλεοτίδιο σε οξειδωμένη μορφή)
HCQ	<i>Hydroxychloroquine</i> (υδροξυχλωροκίνη)
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας)
HIF – 1α	<i>Hypoxia-inducible factor 1α</i> (παράγοντας επαγόμενος από την υποξία 1α)
HRE	<i>Hypoxia response element</i> (στοιχείο απόκρισης στην υποξία)
IFNγ	<i>Interferon gamma</i> (ιντερφερόνη γ)
IgG	<i>Immunoglobulin G</i> (ανοσοσφαιρίνη G)
IL2	<i>Interleukin – 2</i> (ιντερλευκίνη 2)
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας)
MAP	<i>Mitogen activated protein kinase</i> (πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνες ουσίες)
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> (μεταλλοπρωτεϊνάση)
MPO	<i>Myeloperoxidase</i> (μυελοϋπεροξειδάση)
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i> (φωσφορικό νικοτιναμιδο – αδενο – δινουκλεοτίδιο σε αναγμένη μορφή)
NO	<i>Nitric oxide</i> (νιτρικό οξύ)
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> (συνθετάση του νιτρικού οξειδίου)
ODDD	<i>Oxygen dependent degradation domain</i>
oxLDL	<i>Oxidized Low Density Lipoprotein</i> (οξειδωμένη LDL χοληστερόλη)
PAS domain	<i>Per-Arnt-Sim domain</i>
PHDs	<i>prolyl-4-hydroxylases</i> (προλυλ – 4 – υδροξυλάσες)

- PI3K** *Phosphatidylinositol 3-kinase* (κινάση της 3 – φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης)
- PKC** *Protein kinase C* (πρωτεϊνική κινάση C)
- RACK 1** *Receptor for Activated C-Kinase* (υποδοχέας ενεργοποιημένων πρωτεϊνικών κινασών C)
- ROS** *Reactive oxygen species* (δραστικές μορφές οξυγόνου)
- TAD** *Trans – activation domain*
- TCR** *T cell receptor* (υποδοχέας T λεμφοκυττάρων)
- TNF α** *Tumor necrosis factor α* (παράγοντας νέκρωσης όγκων α)
- VCAM – 1** *Vascular cell adhesion molecule 1* (μόριο προσκόλλησης στα αγγειακά κύτταρα – 1)
- VEGF** *Vascular endothelial growth factor* (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας)
- VHL** *Von Hippel–Lindau tumor suppressor*
- VLDL** *Very-low-density lipoprotein* (λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας)

Βιβλιογραφία

1. Αθανασία Τερτίπη, Φίλιππος Καλδρυμίδης, Σ. Τουρνής, Α. Παπατζιάλα, Μ. Ζαχαρίου, Δ. Τοικαλάκης. *Δυσλιπιδαιμίες*. Αθήνα : s.n., 2001. ISBN 9609154-0-7.
2. **Fauci, Braunwald, Isselbacher, Wilson, Martin, Kasper, Hauser, Longo. Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition. s.l. : McGraw-Hill, 1998. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition. s.l. : McGraw-Hill, 1998.***
3. ***Cecil Textbook of Meidicine, 21st Edition***. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 2000.
4. **Χαράλαμπος Κωτίδης, Κωνσταντίνος Μακαρίτσης**. Αντιφλεγμονώδης Δράση των Στατινών και Αθηρωματογένεση. *Καρδιακή Ανεπάρκεια, Τομ. 4, Τευχ. 2, Σελ. 89 - 109*. 2007.
5. **Noel Rose, Marina Afanasyeva**. Autoimmunity: busting the atherosclerotic plaque. *Nature Medicine* 9, 641 - 642. 2003.
6. **Marjo M.P.C. Donners, Sylvia Heeneman, Mat J.A.P. Daemen**. Models of atherosclerosis and transplant arteriosclerosis: the quest for the best. *Elsevier Journal: Drug Discovery Today: Disease Models, Vol 1, No3* 2004. 2004.
7. **Dhanya S.P, Hema C.G**. Small animal models of atherosclerosis. *Calicut Medical Journal* 2008; 6(4): e4. 2008.
8. **Xu, Qingbo**. Mouse Models of Arteriosclerosis. *American Journal of Pathology, Vol. 165, No. 1, July* 2004. 2004.
9. **Drew, Angela F**. *Atherosclerosis Experimental Methods and Protocols*. New Jersey : Humana Press Inc., 2001.
10. **Susanne Zadelaar, Robert Kleemann, Lars Verschuren, Jitske de Vries-Van der Weij**. Mouse Models for Atherosclerosis and. Arteriosclerosis. *Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27;1706-1721, 2007.
11. **Σερέτη, Κωνσταντίνα-Ιωάννα**. Μελέτη του ρόλου της απολιποπρωτεΐνης Ε στην αθηροσκλήρωση - Μεταπτυχιακή διατριβή. Βοστώνη : Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής, 2006.
12. **Avani A. Pendse, Jose M. Arbones-Mainar, Lance A. Johnson, Michael Altenburg, Nobuyo Maeda**. ApoE Knock-out and Knock-in Mice: Atherosclerosis, Metabolic Syndrome, and Beyond. *Journal of Lipid Research*. 2008.
13. **Rebeck, G.W., Kindy, M., and M.J. LaDu**. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the protective effects of apoE2 and E3. *ournal of Alzheimer's Disease*. 4 (6):145-154, 2002. .
14. **Conn, P.Michael**. *Sourcebook of models for biomedical research*. New Jersey : Humana Press Inc, 2008.
15. **ApoE Targeted Mutation Mice**. *Taconic, Hudson, NY*.

16. **Targeting drugs to other important diseases: Atherosclerosis.** *Purdue University, Department of Chemistry.*
17. **Petri, Michelle.** Use of Hydroxychloroquine to Prevent Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus and in Antiphospholipid Antibody–Positive Patients. *Current Rheumatology Reports.* DOI 10.1007/s11926-010-0141-y, 27 October 2010.
18. **Εθνικό συνταγολόγιο.** Αθήνα : ΕΟΦ, 2007.
19. **Leeuw, Karina de.** Dissertation: Premature atherosclerosis in systemic autoimmune diseases. *Netherlands : Departments of Internal Medicine, Rheumatology & Clinical Immunology, University of Groningen, 2008.*
20. **Koch, Zoltán Szekanecz and Alisa E.** Review: Vascular involvement in rheumatic diseases: ‘vascular rheumatology. *Arthritis Research & Therapy.* 10 October 2008 .
21. **Michael H. Edwards, MD.** Hydroxychloroquine Reverses Thrombogenic Properties of Antiphospholipid Antibodies in Mice. *Circulation.* 1997.
22. **Elisabet Svenungsson, Kerstin Jensen-Urstad, Mikael Heimbürger, Angela Silveira, Anders Hamsten, Ulf de Faire, Joseph L. Witztum and Johan Frostegård.** Risk Factors for Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus. *Circulation* 2001;104;1887-1893.
23. **L. S. Tam, E. K. Li, C. WK Lam, B. Tomlinson.** Hydroxychloroquine has no significant effect on lipids and apolipoproteins in Chinese systemic lupus erythematosus patients with mild or inactive disease. *Lupus* July 2000 vol. 9 no. 6 413-416.
24. **Wenger, Roland H.** Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB Journal.* 2002.
25. **Semenza, Gregg L.** O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. . *Journal of Applied Physiology.* 2004.
26. **Hao Zhu, Tim Jackson and H. Franklin Bunn.** Detecting and responding to hypoxia. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2002.
27. **Guang L. Wang, Bing-Hua Jiang, Elizabeth A. Rue, Gregg L. Semenza.** Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS. *PNAS, Vol. 92, pp. 5510-5514, June 1995, Genetics.*
28. **U. Berchner-Pfannschmidt, S. Frede, C. Wotzlaw and J. Fandrey.** Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing. *European Respiratory Journal,* 2008; 32: 210–217.
29. **Semenza, Gregg L.** HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes & Development.* 2000.
30. **Sharma, Gaurav Mrinal.** Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) and its Role in Tumour Progression to Malignancy. *OJHAS Vol. 7, Issue 2: (2008 Apr-Jun).*

31. **Semenza, Gregg L.** Involvement of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Pulmonary Pathophysiology. *Chest* 2005;128;592S-594S.
32. **Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer.** *Βιοχημεία (Τόμος Ι)*. Ηράκλειο : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2006. ISBN: 960-254-190-0.
33. **Ashcroft, Veronica A. Carroll and Margaret.** HIF-1a regulation by proline hydroxylation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Vol. 7; Issue 6; 15 April 2005 .
34. **Semenza, Gregg L.** Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology* 24: 97–106, 2008; doi:10.1152/physiol.00045.2008.
35. **Annika Asplund, Gunnel Ostergren-Lunden, German Camejo, Pia Stillemark-Billton, Goran Bondjers.** Hypoxia increases macrophage motility, possibly by decreasing the heparan sulfate proteoglycan biosynthesis. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 86 no. 2 381-388 . 2009.
36. **Judith C. Sluimer, Jean-Marie Gasc, Job L. van Wanroij, Natasja Kisters, Mathijs Groeneweg, Maarten D. Sollewijn Gelpke, Jack P. Cleutjens, Luc H. van den Akker, Pierre Corvol, Bradly G. Wouters, Mat J. Daemen, and Ann-Pascale J. Bijnens.** Hypoxia, Hypoxia-Inducible Transcription Factor, and Macrophages in Human Atherosclerotic Plaques Are Correlated With Intraplaque Angiogenesis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008.
37. **Jeremy Ben-Shoshan, Arnon Afek, Sofia Maysel-Auslender, Aya Barzelay, Ardon Rubinstein, Gad Keren, Jacob George.** *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2009;29:665-670.
38. **José Blanco Pampín M.D., Ph.D, Sonia Aranzazu García Rivero M.D, Xosé Luis Otero Cepeda M.S., Ph.D, Angel Vázquez Boquete B.S, Jerónimo Forteza Vila M.D., Ph.D, #.** Immunohistochemical Expression of HIF-1α in Response to Early Myocardial Ischemia. *Journal of Forensic Sciences, Volume 51, Issue 1, pages 120–124, January 2006.*
39. **Ela Karshovska, Alma Zerneck, Gueler Sevilimis, Andrea Millet, Mihail Hristov, Clemens D. Cohen, Holger Schmid, Florian Krotz, Hae-Young Sohn, Volker Krauss, Christian Weber, Andreas Schober.** Expression of HIF-1 in Injured Arteries Controls SDF-1–Mediated Neointima Formation in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007.
40. **Μακαρίτσης Κ., Ιωάννου Μ., Καπάτου Κ., Κουβαράς Ε., Μπέγας Η., Κουκούλης Γ., Νταλέκος Γ.** Η υδροξυχλωροκίνη προκαλεί επιδείνωση της αθηρωμάτωσης σε ApoE knock out ποντίκια. 2ο Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, Λάρισα, 2010.
41. **Beverly Paigen, Brian Y. Ishida, Judy Verstuyft, Robert B. Winters, and Deborah Albee.** Atherosclerosis Susceptibility Differences among Progenitors of Recombinant Inbred Strains of Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1990;10;316-323.
42. **Kingshuk Roy Choudhury, Kevin J. Yagle, Paul E. Swanson, Kenneth A. Krohn and Joseph G. Rajendran.** A Robust Automated Measure of Average Antibody Staining in

Immunohistochemistry Images. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Volume 58(2): 95–107, 2010.

43. **Seinosuke Kawashima, Mitsuhiro Yokoyama**. Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:998-1005.

44. **Claudio Napoli, Filomena de Nigris, Sharon Williams-Ignarro, Orlando Pignalosa, Vincenzo Sica, Louis J. Ignarro**. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry, Nitric Oxide 15 (2006) 265–279*. Elsevier.

45. **Mary J. Roman, Beth-Ann Shanker, Adrienne Davis, Michael D. Lockshin, Lisa Sammaritano, Ronit Simantov, Mary K. Crow, Joseph E. Schwartz, Stephen A. Paget, Richard B. Devereux, and Jane E. Salmon**. Prevalence and Correlates of Accelerated Atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus. *The New England Journal of medicine*. N Engl J Med 2003;349:2399-406.

46. **Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, Hirata K, Yasui H, Sakurai H, Yoshida Y, Masada M, Yokoyama M**. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2002;110(3):331-40.

47. **Michael H. Davidson, Terry A. Jacobson**. Classification of Lipoproteins. *MedscapeCME*.

48. **Todd R. Olson, Albert Einstein College of Medicine, New York Wojciech Pawlina, Mayo Clinic**. *A.D.A.M. Student Atlas of Anatomy, 2nd Edition*. s.l. : Cambridge University Press, 2008. ISBN: 9780521710053.