

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής Φ. Τρυποσκιάδης

Διδακτορική Διατριβή

«ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ Asp299Gly ΚΑΙ Thr399Ile ΤΟΥ  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ TLR4 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗ ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΝΟΣΟ»

Υπό

του ΑΝΔΡΕΑ ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ

Καρδιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2020

© 2020 ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

## Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής (επιβλέπων)** **Ιωάννης Σκουλαρίγκης**  
Καθηγητής Καρδιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής** **Νικόλαος Βαμβακόπουλος**  
Ομότιμος Καθηγητής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής** **Ιωάννης Στεφανίδης**  
Καθηγητής Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής** **Σπυρίδων Ποταμιάνος**  
Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής** **Ανδρέας Καψωριτάκης**  
Καθηγητής Παθολογίας – Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής** **Ευθυμία Πετεινάκη**  
Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής** **Σωτήριος Σωτηρίου**  
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το κλινικό μέρος της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Πανεπιστημιακή Καρδιολογική Κλινική του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Διευθυντής ο Καθηγητής Φ. Τρυποσκιάδης). Για την ομάδα ελέγχου επιλέχθηκαν υγιείς εθελοντές αιμοδότες από το Εργαστήριο Αιμοδοσίας – Αιματολογίας (Διευθύντρια η Καθηγήτρια Δ. Κυριάκου). Το εργαστηριακό μέρος πραγματοποιήθηκε στα Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής (Διευθυντής ο Καθηγητής Ν. Βαμβακόπουλος) του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα και τα μέλη της τριμελούς επιτροπής καθώς και τους διευθυντές της κλινικής και των εργαστηρίων που συνεργάστηκα για την εμπιστοσύνη τους και την υποστήριξη που μου παρείχαν.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιολογίας Ν. Βαμβακόπουλο, για την αμέριστη συμπαράσταση του από τη στιγμή της γνωριμίας μας.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τους ασθενείς και του υγιείς εθελοντές αιμοδότες που τόσο πρόθυμα συμμετείχαν στη μελέτη, καθώς και όλους όσους με οποιοδήποτε τρόπο βοήθησαν στην ολοκλήρωση της.

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Όνοματεπώνυμο: Ανδρέας Σιδηρόπουλος

Διεύθυνση κατοικίας: Κηφισίας 87 Β, 54248, Θεσσαλονίκη

Τηλεφωνική επικοινωνία: 2311242652, 6972728440

Διεύθ. ηλεκτρον. ταχυδρομείου: achsid@gmail.com

Αποφοίτησε από την Ιατρική Σχολή του Α.Π.Θ το 1997. Υπηρέτησε την στρατιωτική του θητεία ως οπλίτης ιατρός στη Σαμοθράκη και στη Στρατιωτική Σχολή Αξιωματικών Σωμάτων (Θεσσαλονίκη). Ολοκλήρωσε την υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου στο άγονο αγροτικό ιατρείο Δαμασκηιάς, Βόιου, Ν. Κοζάνης. Εκπαιδεύτηκε στην Παθολογία (ΓΝΘ Ο Άγιος Δημήτριος), στη Νεφρολογία (ΠΓΝ ΑΧΕΠΑ), στην Αιματολογία (ΠΓΝ Αλεξανδρούπολης) και τελικά στην Καρδιολογία στο Γενικό Νοσοκομείο Ημαθίας (Βέροιας), από όπου έλαβε και τον τίτλο ειδίκευσης στην Καρδιολογία το 2008.

Υπηρέτησε ακολούθως ως Επικουρικός Καρδιολόγος στο Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης (2009-2010) και ως Επιμελητής Β΄ στο Νοσοκομείο Ημαθίας (Βέροια) μέχρι το 2013. Έκτοτε εργάζεται ως ελεύθερος επαγγελματίας, διατηρώντας ιδιωτικό ιατρείο στη Θεσσαλονίκη και στο Τσοτύλι, Ν. Κοζάνης, ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνος καρδιολόγος διαγνωστικού κέντρου στη Θεσσαλονίκη.

Είναι πιστοποιημένος στην Καρδιακή Ανεπάρκεια από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Καρδιακής Ανεπάρκειας (Heart Failure Association of European Society of Cardiology) και έχει Πιστοποιητικό Μετεκπαίδευσης στη Θρόμβωση (Excellence in Thrombosis από το Ινστιτούτο Μελέτης και Έρευνας στη Θρόμβωση και την Αντιθρομβωτική Αγωγή) και τη Λιπιδιολογία (Excellence in Lipidology από την Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης). Επίσης έχει πιστοποίηση Advanced Trauma Life Support (ATLS) Provider, Advanced Life Support (ALS) Provider, Paediatric Life Support (PLS) και είναι Advanced Life Support National Full Instructor και Instructors Trainer.

Είναι μέλος των ακόλουθων επιστημονικών εταιρειών: Ελληνική Καρδιολογική Εταιρεία, Καρδιολογική Εταιρεία Βόρειας Ελλάδας, Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης, Ευρωπαϊκή Καρδιολογική Εταιρεία (European Society of Cardiology), Εταιρεία Καρδιακής Ανεπάρκειας της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρείας (Heart Failure Association of the ESC), Ευρωπαϊκή Εταιρεία Καρδιαγγειακής Πρόληψης και Αποκατάστασης (European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation), Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Υπέρτασης (Council on Hypertension), Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Αγγειακών Εγκεφαλικών (Council on Hypertension).

Έχει συμμετοχή σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια, στην εκπόνηση ανακοινωμένων και αναρτημένων εργασιών σε αντίστοιχα συνέδρια, καθώς και δημοσιεύσεις σε ελληνικά και διεθνή ιατρικά περιοδικά.

**«ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ Asp299Gly ΚΑΙ Thr399Ile ΤΟΥ  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ TLR4 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗ ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΝΟΣΟ»**

**ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΣ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**1. Ιωάννης Σκουλαρίγκης,**

Καθηγητής Καρδιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

**2. Νικόλαος Βαμβακόπουλος,**

Ομότιμος Καθηγητής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**3. Ιωάννης Στεφανίδης,**

Καθηγητής Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Περίληψη

**Στόχος:** Εκτός από τους παραδοσιακούς, αρκετοί νεότεροι παράγοντες έχουν προταθεί ως προδιαθεσικοί ή προστατευτικοί της εμφάνισης ισχαιμικής καρδιακής νόσου και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2). Ειδικότερα, δύο πολυμορφισμοί του υποδοχέα TLR4 (Asp299Gly και Thr399Ile) έχουν πρόσφατα αναγνωρισθεί ως πιθανά προστατευτικοί έναντι του ΣΔ2 και της διαβητικής νευροπάθειας ή προδιαθεσικοί για την εκδήλωση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας. Η συσχέτιση των αλληλόμορφων αυτών γονιδίων με τον κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικής καρδιακής νόσου είναι αμφιλεγόμενη, ενώ ο ρόλος τους στην εμφάνιση ισχαιμικής καρδιακής νόσου που συνδέεται με τον διαβήτη δεν έχει ποτέ μελετηθεί.

**Σχεδιασμός και μέθοδοι:** Προκειμένου να διευκρινιστεί η πιθανή σχέση των πολυμορφισμών του TLR4 με τη σχετιζόμενη με τον ΣΔ2 ισχαιμική καρδιακή νόσο, εξετάσθηκε η κατανομή των μεταλλάξεων Asp299Gly και Thr399Ile, σε 286 διαβητικούς ασθενείς και 413 μη διαβητικούς μάρτυρες, με ή χωρίς ισχαιμική καρδιακή νόσο.

**Αποτελέσματα:** Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα γονίδια εντοπίστηκαν κυρίως σε μη-διαβητικά άτομα 79/413 έναντι 15/286 διαβητικών ασθενών ( $P < 0.0001$ ). Η συχνότητα ανίχνευσης για τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα γονίδια ήταν παρόμοια μεταξύ διαβητικών ασθενών με ή χωρίς ισχαιμική καρδιακή νόσο (7/142 έναντι 8/144,  $p > 0.1$ ), ενώ αποδείχθηκε διαφορετική μεταξύ των μη-διαβητικών ατόμων με ή χωρίς ισχαιμική καρδιακή νόσο (39/145 vs 40/268,  $P = 0,004$ ). Μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση, η διαφορά μεταξύ διαβητικών και μη διαβητικών, όσον αφορά στις μεταλλάξεις του TLR4 μόνος, παρέμεινε σημαντική ( $P = 0,04$ ).

**Συμπεράσματα:** Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα TLR4, Asp299Gly και Thr399Ile, παρέχουν προστασία έναντι του ΣΔ2. Ωστόσο, η παρουσία τους δεν φαίνεται να παίζει κανένα ρόλο, προστατευτικό ή επιβαρυντικό, στην εκδήλωση της ισχαιμικής καρδιακής νόσου τόσο σε διαβητικά όσο και σε μη-διαβητικά άτομα.



## Abstract

**Objective:** Except from traditional, several novel factors have been proposed either predisposing for or protecting from the onset of ischaemic heart disease (IHD) and diabetes mellitus type 2 (DM2). Two specific polymorphisms of toll-like receptor 4 (TLR4; Asp299Gly and Thr399Ile) have recently been identified either as candidate protector genes against DM2 and associated neuropathy or risk alleles for the manifestation of diabetic retinopathy. The impact of these alleles on the risk for ischaemic heart disease is controversial while their role in diabetes associated IHD has never been studied.

**Design and methods:** In order to clarify the potential impact of TLR4 polymorphisms on diabetes-related IHD vulnerability, the distribution of the mutant TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile alleles in 286 DM2 patients and 413 non-DM2 controls with or without IHD, was examined.

**Results:** Mutant alleles were predominantly detected in 79/413 non-diabetic individuals versus 15/286 DM2 patients ( $P < 0.0001$ ). The rates of positivity for mutant alleles were similar among diabetic patients with or without IHD (7/142 vs 8/144,  $P > 0.1$ ), whereas they proved different among non-diabetic individuals with or without IHD (39/145 vs 40/268,  $P = 0.004$ ). Following multivariate analysis, the difference between diabetic and non-diabetic subjects, with regard to TLR4 mutations alone, remained significant ( $P = 0.04$ ).

**Conclusions:** Mutant TLR4 alleles confer protection against DM2. However, their presence does not seem to play any role, protective or aggravating, in the manifestation of IHD either in diabetic or in non-diabetic individuals.

<b>Πίνακας Περιεχομένων</b>	σελ.
Ευχαριστίες	4
Σύντομο βιογραφικό σημείωμα	5
Περίληψη	8
Abstract	9
Συντομογραφίες	12
<b>Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή</b>	<b>15</b>
1.1 Η Ισχαιμική Καρδιακή Νόσος	15
1.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία	15
1.1.2 Ορισμός	17
1.1.3 Κλινικές εκδηλώσεις	17
1.1.4 Παθοφυσιολογία της Μυοκαρδιακής Ισχαιμίας	18
1.1.5 Σχηματισμός της Αθηρωματικής Πλάκας	19
1.1.6 Παράγοντες κινδύνου	36
α. Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου	37
β. Νεότεροι παράγοντες κινδύνου	43
1.2 Ο ρόλος της Φλεγμονής στις Καρδιαγγειακές Παθήσεις	47
1.2.1 Η οικογένεια των ανάλογων των Toll υποδοχέων	49
1.2.2 Ο TLR4	50
α. TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια	53
i) Το MyD88-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι	53
ii) Το MyD88-ανεξάρτητο σηματοδοτικό μονοπάτι	56
1.2.3 Ο ρόλος του TLR4 στη Μυοκαρδιακή Φλεγμονή	58
α. Μυοκαρδίτιδα	58
β. Έμφραγμα Μυοκαρδίου	59
γ. Μυοκαρδιακή βλάβη από Ισχαιμία / Επαναιμάτωση	61
δ. Καρδιακή Ανεπάρκεια και Μυοκαρδιακή Αναδιαμόρφωση	62
στ. Αθηροσκλήρωση	63
ζ. Πολυμορφισμοί του TLR4 και Ισχαιμική Καρδιοπάθεια	66
η. Πολυμορφισμοί του TLR4 και η σχετιζόμενη με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 Ισχαιμική Καρδιοπάθεια	67

<b>Κεφάλαιο 2 Σχεδιασμός και Μέθοδοι</b>	68
2.1 Πληθυσμός Μελέτης	68
2.2 Εργαστηριακό Μέρος: μεθοδολογία και πρωτόκολλα	73
2.2.1 Διαδικασία Γονοτυπικής Ανάλυσης Επιγραμματικά	73
2.3 Συνήθεις εργαστηριακές εξετάσεις	75
2.4 Στατιστική ανάλυση	75
2.5 Ηθική και Δεοντολογία	76
<b>Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα</b>	77
<b>Κεφάλαιο 4 Συζήτηση</b>	80
<b>Κεφάλαιο 5 Συμπεράσματα και Κλινικές Προοπτικές</b>	84
<b>Βιβλιογραφία</b>	89
<b>Παράρτημα</b>	122

## Συντομογραφίες

ACE-I	Angiotensin-converting-enzyme inhibitor
AP-1	Activator protein-1
apoE	Apolipoprotein E
AM	Autoimmune myocarditis
BMI	Body mass index
CD14	Cluster of differentiation 14
CI	Confidence interval
CRP	C-reactive protein
CVB3	Coxsackie virus B3
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DM	Diabetes Mellitus
GMCSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HbA1c	Glycated hemoglobin
HLA-DRA	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain
HDL	High-density lipoprotein
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HMGB1	High mobility group box 1
IFN	Interferon
I $\kappa$ B	Inhibitory $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL	Interleukin
I/R	Ischemia/reperfusion
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon-regulatory factor

JNK	c-Jun N-terminal kinases
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LDL	Low-density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
LVAD	Left ventricular assist device
Mal	Myelin and lymphocyte protein
MAPK	mitogen-activated proteinkinase
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
MCSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MD2	Myeloid differentiation factor 2
MI	Myocardial infarction
MMPs	Matrix metallopeptidases
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
NO	Nitric oxide
OD	Odds ratio
ODadj	Adjusted odds ratio
oxLDL	Oxidized low-density lipoprotein
p38	Mitogen-activated protein kinases
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PRRs	Pattern recognition receptors
RIP1	Receptor-interacting protein 1

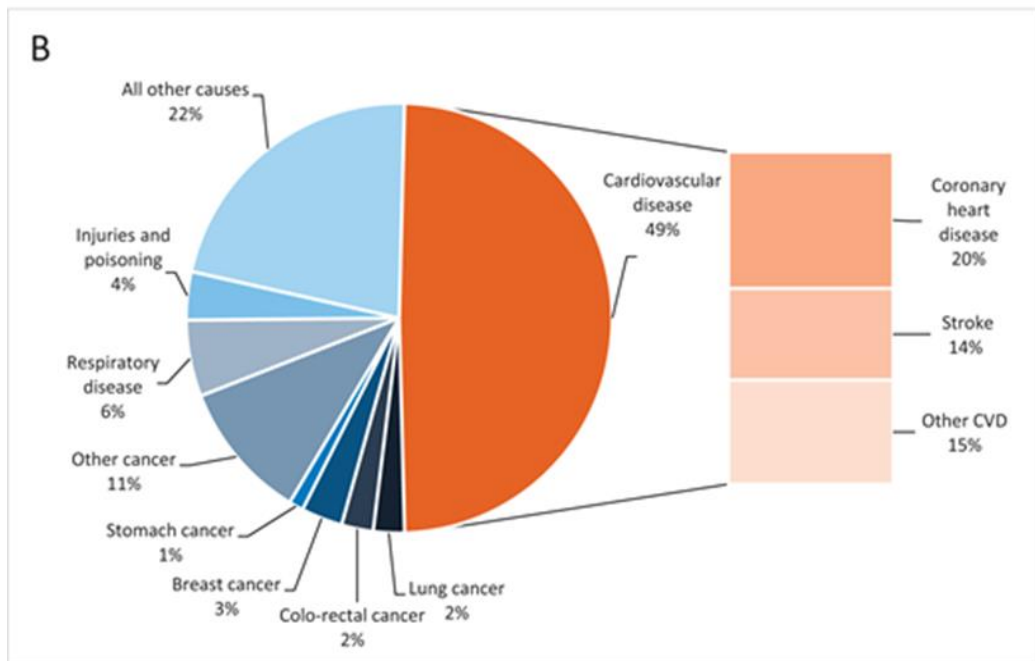
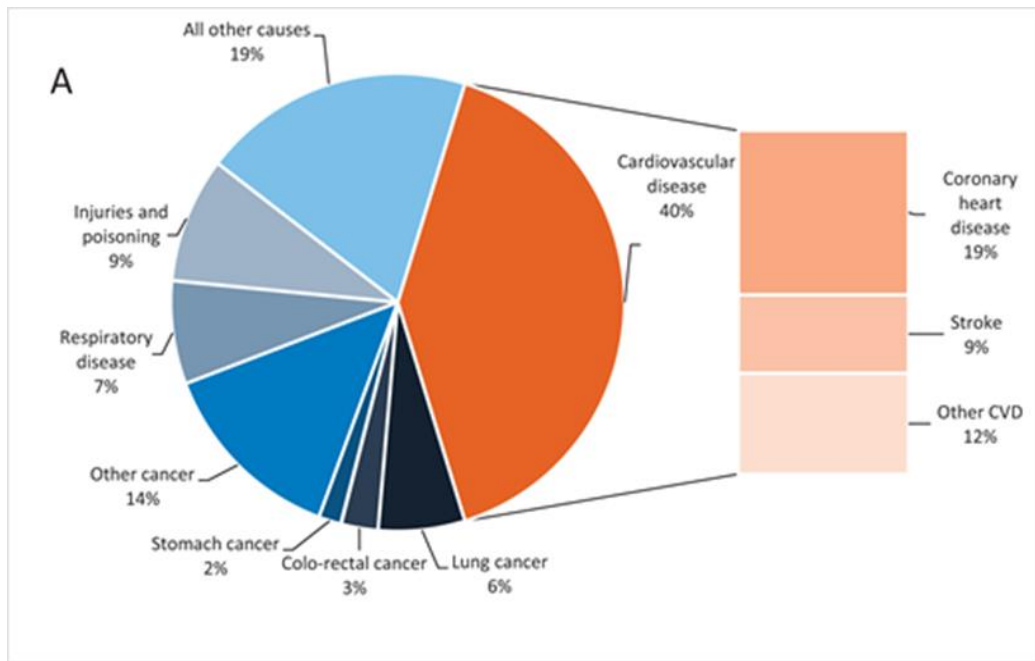
ROS	Reactive oxygen species
RP105	Radioprotective 105
SNP	Single nucleotide polymorphisms
SR	Scavenger receptor
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TAB	Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1-binding protein
TAK1	TGF- $\beta$ -activated protein kinase 1
TBK1	TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator-binding kinase 1
TCFA	Thin-Cap Fibroatheroma
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
tPA	Tissue plasminogen activator
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
UBC13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
UEV1A	Ubiquitin-conjugating enzyme variant 1A
VMC	Viral myocarditis
vWF	von Willebrand factor

## Κεφάλαιο 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Η Ισχαιμική Καρδιακή Νόσος

**1.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία:** Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αναγνωρίζονται ως ένας σημαντικός φραγμός στην ανθρώπινη ανάπτυξη και ευθύνονταν το 2015 για τους μισούς σχεδόν θανάτους παγκοσμίως [1, 2]. Ειδικότερα η ισχαιμική καρδιακή νόσος (εικόνα 1) [3], ευθύνεται για 8,9 εκατομμύρια θανάτους και 164 εκατομμύρια έτη συνεπαγόμενης αναπηρίας (DALYs) παγκοσμίως το 2015 [4-6], επηρεάζει σημαντικά και τα δύο φύλα με μεγαλύτερη προτίμηση στον ανδρικό πληθυσμό και είναι υπεύθυνη για το ένα τρίτο περίπου των θανάτων σε ηλικία άνω των 35 ετών.

Η ισχαιμική καρδιακή νόσος είναι μια περίπλοκη, πολυπαραγοντική ασθένεια, η ανάπτυξη και εξέλιξη της οποίας καθορίζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με την υπέρταση, την υψηλή χοληστερόλη, τη δίαιτα πλούσια σε νάτριο, το κάπνισμα [7-9] και τη φλεγμονή. Επιπλέον, αν και η θνητότητα από ισχαιμική καρδιοπάθεια μειώθηκε στις ανεπτυγμένες χώρες τις τελευταίες τρεις δεκαετίες [10], αυξάνεται σταθερά σε πολλές χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος [11-14].



Note: no data available for Andorra.  
 Source: WHO Mortality Database.

**Εικόνα 1.** Η σχετική κατανομή των κύριων αιτίων θανάτου σε άνδρες (A) και γυναίκες (B).



**1.1.2 Ορισμός:** Ο όρος *ισχαιμική καρδιακή νόσος* ή *ισχαιμική καρδιοπάθεια* περιγράφει μια ομάδα κλινικών συνδρόμων που χαρακτηρίζεται από μυοκαρδιακή ισχαιμία, δηλαδή μια ανισορροπία μεταξύ παροχής και αναγκών αίματος. Επειδή ο θεμελιώδης παθοφυσιολογικός μηχανισμός της μυοκαρδιακής ισχαιμίας είναι η ανεπαρκής αιμάτωση του μυοκαρδίου, η ισχαιμία σχετίζεται όχι μόνο με ανεπαρκή διαθεσιμότητα οξυγόνου, αλλά και με μειωμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και ανεπαρκή απομάκρυνση των τελικών μεταβολικών προϊόντων. Στη μυοκαρδιακή ισχαιμία οι επιπτώσεις της στέρησης οξυγόνου και θρεπτικού υποστρώματος δεν μπορούν να διαχωριστούν από τις επιπτώσεις της μειωμένης απομάκρυνσης των τελικών μεταβολικών προϊόντων. Σε συνθήκες που συνδέονται με μεμονωμένη υποξαιμία και διατηρημένη αιμάτωση (όπως κυανωτικές συγγενείς καρδιοπάθειες, σοβαρή αναιμία, ή προχωρημένη νόσος των πνευμόνων) οι δυσμενείς συνέπειες για το μυοκάρδιο είναι γενικά λιγότερο εμφανείς, τονίζοντας την σημασία της απομάκρυνσης των άχρηστων και επιβλαβών τελικών μεταβολικών προϊόντων και της παροχής με μεταβολικά υποστρώματα στην παθογένεση της ισχαιμικής βλάβης. Οι όροι *ισχαιμική καρδιακή νόσος*, *ισχαιμική καρδιοπάθεια* και *στεφανιαία νόσος*, θα χρησιμοποιούνται στη συνέχεια του κειμένου ως ισοδύναμοι.

**1.1.3 Κλινικές Εκδηλώσεις:** Τα κλινικά σύνδρομα της ισχαιμικής καρδιοπάθειας προκαλούν περισσότερους θανάτους, νοσηρότητα και οικονομική επιβάρυνση στις δυτικές κοινωνίες από οποιαδήποτε άλλη ομάδα ασθενειών. Εκτιμάται ότι 16.3 εκατομμύρια Αμερικανοί πάσχουν από ισχαιμική καρδιοπάθεια. Η εκτιμώμενη ετήσια επίπτωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, της πλέον θανατηφόρας οξείας εκδήλωσης της ισχαιμικής καρδιοπάθειας, είναι 610.000 νέες και 325.000 επαναλαμβανόμενες περιπτώσεις. Παρά την προοδευτική μείωση της θνησιμότητας από ισχαιμική καρδιοπάθεια λόγω βελτίωσης των θεραπευτικών στρατηγικών και των μέτρων πρόληψης, 1 στους 6 θανάτους στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2007 οφειλόταν στη στεφανιαία νόσο. Στους περισσότερους ασθενείς με ισχαιμική καρδιοπάθεια, η αιτία της ισχαιμίας του μυοκαρδίου είναι η μείωση της στεφανιαίας ροής αίματος λόγω αθηροσκληρωτικής στεφανιαίας νόσου. Λόγω της αργής εξέλιξης της

στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης και της χωρητικότητας των μεγάλων στεφανιαίων αρτηριών, υπάρχει συνήθως μια μακρά περίοδος σιωπηλής στεφανιαίας νόσου με βαθμιαία στένωση του αυλού πριν την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων ισχαιμίας. Οι εκδηλώσεις της ισχαιμικής καρδιοπάθειας εξαρτώνται από τη διάρκεια, σοβαρότητα και οξύτητα των ισχαιμικών επεισοδίων. Ξαφνική, κρίσιμη μείωση της στεφανιαίας ροής είναι ο υποκείμενος μηχανισμός στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα (ACS), ένα φάσμα κλινικών καταστάσεων που περιλαμβάνει την ασταθή στηθάγχη, το έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάσπαση του ST διαστήματος, και το έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST διαστήματος. Αντίθετα, στη χρόνια ισχαιμική καρδιοπάθεια, η παρουσία αιμοδυναμικά σημαντικών στενώσεων στις στεφανιαίες αρτηρίες, περιορίζει την ικανότητα της καρδιάς να αυξήσει την παροχή αίματος σε απάντηση στις αυξημένες απαιτήσεις του μυοκαρδίου σε οξυγόνο, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη στηθάγχης, μια κατάσταση παροδικής οπισθοστερνικής δυσφορίας. Υπερκοιλιακές και κοιλιακές αρρυθμίες καθώς και ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος αποτελούν συνήθεις εκδηλώσεις τόσο των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων όσο και της χρόνιας ισχαιμικής καρδιοπάθειας.

**1.1.4 Παθοφυσιολογία της Μυοκαρδιακής Ισχαιμίας:** Η καρδιά είναι ένα κατεξοχήν αερόβιο όργανο. Το μυοκάρδιο σε συνθήκες ηρεμίας, αποσπά περίπου το 75% του παρεχόμενου οξυγόνου, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας με οξειδωτικό μεταβολισμό, δηλαδή αντλεί το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειάς από τη μιτοχονδριακή αναπνοή και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η μυοκαρδιακή ισχαιμία συμβαίνει όταν οι ενεργειακές απαιτήσεις του μυοκαρδίου υπερβαίνουν τη δυνατότητα των μιτοχονδρίων να παράγουν ενέργεια λόγω ανεπαρκούς παροχής οξυγόνου, και η παραγωγή ενέργειας μετατοπίζεται στην αναερόβια. Η αναερόβια γλυκόλυση είναι μια ανεπαρκής διαδικασία παραγωγής ενέργειας η οποία δεν μπορεί να αντισταθμίσει την απώλεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, και το ισχαιμικό μυοκάρδιο χαρακτηρίζεται από ένα αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο, με προοδευτική απώλεια των φωσφορικών αποθεμάτων. Επιπλέον, η υδρόλυση των νουκλεοτιδίων αδενίνης και η παραγωγή γαλακτικού οξέος οδηγεί σε μια προοδευτική αύξηση της παραγωγής οξέος με αποτέλεσμα το ισχαιμικό

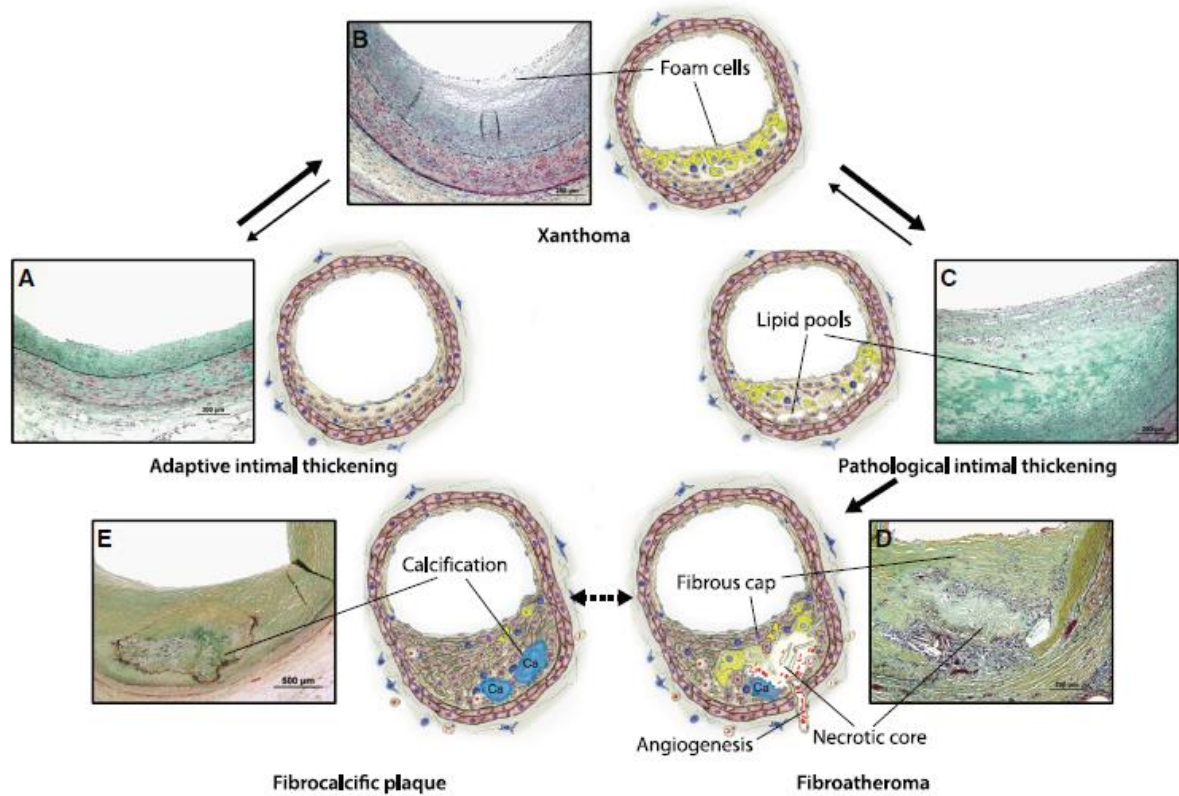
μυοκάρδιο να χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική μείωση του ιστικού pH. Ο ρυθμός και η έκταση της ελάττωσης των φωσφορικών αποθεμάτων και του pH ποικίλει και εξαρτάται από το βαθμό της μείωσης της ροής του αίματος, την έκταση της ισχαιμίας και τη λειτουργική κατάσταση του μυοκαρδίου [15].

### **1.1.5 Ο σχηματισμός της Αθηρωματικής Πλάκας**

Οι μηχανισμοί της αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής νόσου που προκαλείται από την LDL και άλλους αιτιώδεις παράγοντες είναι πολύπλευροι και όπως συζητείται παρακάτω περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, τη συμμετοχή φλεγμονωδών κυττάρων, το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, την απόπτωση και τη νέκρωση, τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, τη σύνθεση της διάμεσης ουσίας, την ασβεστοποίηση, την αγγειογένεση, την αρτηριακή αναδιαμόρφωση, τη ρήξη της ινώδους κάψας και τη θρόμβωση. Υπάρχει μια σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των διεργασιών και μια μεταβλητή σημασία της κάθε διαδικασίας στην ανάπτυξη μεμονωμένων πλακών που οδηγούν σε ποικίλη εξέλιξη, ετερογενή μορφολογία πλάκας και διαφορετικά κλινικά αποτελέσματα. Οι περισσότερες πλάκες παραμένουν ασυμπτωματικές (υποκλινική νόσος), ορισμένες γίνονται αποφρακτικές (σταθερή στηθάγχη) και άλλες προκαλούν οξεία θρόμβωση οδηγώντας σε οξεία στεφανιαία σύνδρομα (ACS).

### **Ταξινόμηση βλαβών**

Η παθογένεση των αθηροσκληρωτικών βλαβών συνάγεται από την μικροσκοπική ανάλυση στεφανιαίων αρτηριών σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες. Η πιο σύγχρονη και απλούστερη ιστολογική ταξινόμηση των κύριων τύπων αθηροσκληρωτικών βλαβών [16], τονίζει τη σχέση μεταξύ της μορφολογίας των βλαβών και των κλινικών εκδηλώσεων και χρησιμοποιείται ευρύτερα στην πράξη, εμφανίζεται στην εικόνα 2. Ένας ασθενής με προχωρημένη νόσο συνήθως διαθέτει πολλούς διαφορετικούς τύπους βλαβών σε διαφορετικές περιοχές του αρτηριακού δέντρου.



**Εικόνα 2.** Τύποι αθηροσκληρωτικών βλαβών και η ακολουθία της ανάπτυξης τους.

### Θέσεις προτίμησης

Η αθηροσκλήρωση είναι μια πολυεστιακή νόσος με μεγαλύτερη προτίμηση σε ορισμένες περιοχές του αρτηριακού δέντρου. Περιοχές με χαμηλή ενδοθηλιακή διατμητική πίεση, που βρίσκονται κοντά σε σημεία έκφυσης και διακλάδωσης και σε καμπές των αγγείων είναι πιο επιρρεπείς [17]. Η κοιλιακή αορτή, οι στεφανιαίες αρτηρίες, οι λαγονομηριαίες αρτηρίες, και ο διχασμός των καρωτίδων είναι αυτές που επηρεάζονται συχνότερα. Πριν από την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, αυτές οι περιοχές χαρακτηρίζονται από μεταβολές της ενδοθηλιακής λειτουργίας, υπενδοθηλιακή παρουσία δενδριτικών κυττάρων [18], και πάχυνση του έσω χιτώνα (Εικ. 2Α) [19,20]. Η προσαρμοστική πάχυνση του έσω χιτώνα αναπτύσσεται με την πρόοδο της ηλικίας και αποτελεί κατάλληλο έδαφος για την ανάπτυξη της αρχικής βλάβης [20], και ο ρυθμός εξέλιξης παραμένει υψηλότερος από ό, τι σε άλλες αρτηριακές περιοχές. Ωστόσο, με το χρόνο, η νόσος εξαπλώνεται σε παρακείμενες περιοχές [21]. Πειράματα σε ζώα υποδεικνύουν αιτιώδη σχέση

μεταξύ χαμηλής διατημητικής πίεσης και έναρξης της αθηροσκλήρωσης [22], χωρίς ο υποκείμενος μηχανισμός να είναι πλήρως κατανοητός. Καθώς αναπτύσσεται η πλάκα και αναδιαμορφώνεται το αρτηριακό τοίχωμα, αλλάζουν οι τοπικές συνθήκες ροής. Αυτή η δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ της ροής και του τοιχώματος του αγγείου μπορεί να επηρεάσει την πρόοδο της νόσου και τελικά την εξέλιξη των βλαβών.

### **Η επαγόμενη από τις λιποπρωτεΐνες φλεγμονή**

Η LDL χοληστερόλη προκαλεί αθηροσκλήρωση με τη συσσώρευση της στο αρτηριακό τοίχωμα, όπου τροποποιείται με οξειδωση [23]. Τα οξειδωμένα μόρια LDL, με τη σειρά τους δρουν ως χρόνιοι διεγέρτες της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας. Διεγείρουν την παραγωγή μορίων προσκόλλησης (π.χ. VCAM-1, ICAM-1) από τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, χημειοελκυστικών ουσιών (π.χ. MCP-1), και αυξητικών παραγόντων (π.χ. M-CSF και GM-CSF) που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς των μονοκυττάρων και διεγείρουν τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση τους σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα [24, 25]. Η σύνδεση της LDL με τις πρωτεογλυκάνες είναι ένα σημαντικό βήμα για την έναρξη της νόσου [26], το οποίο μπορεί δυνητικά να εξηγήσει την προτίμηση της αθηροσκλήρωσης στις προσαρμοστικές παχύνσεις του έσω χιτώνα των αρτηριών.

Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται το ενδοθήλιο γίνεται πιο διαπερατό για τα μόρια της LDL, και η έκφραση μορίων δέσμησης λιποπρωτεϊνών στην πλάκα μπορεί να προωθήσει περαιτέρω τη συσσώρευση της LDL [27]. Τα προσελκυστικά μακροφάγα εκφράζουν αρκετούς διαφορετικούς φαινότυπους και ασκούν πολλαπλές επιδράσεις στην ανάπτυξη των βλαβών [28]. Η σύνδεση των τροποποιημένων μορίων της LDL σε υποδοχείς TLR των μακροφάγων οδηγεί στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ., IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$ ), ενζύμων (π.χ. μυελοϋπεροξειδάσης), και δραστικών μορφών οξυγόνου, που προωθούν την περαιτέρω κατακράτηση και τροποποίηση των μορίων LDL, καθώς και άλλων μεσολαβητών που διαδραματίζουν ρόλο στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.

Το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει την τροποποιημένη LDL και άλλα αυτοαντιγόνα που σχετίζονται με την αθηροσκληρωτική

διαδικασία, και συμμετέχει στην ανάπτυξη των βλαβών [24]. Τα T-1 βοηθητικά λεμφοκύτταρα εμφανίζονται στον έσω χιτώνα ταυτόχρονα με τα αφρώδη κύτταρα και εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η ιντερφερόνη- $\gamma$  και ο TNF- $\alpha$ , που επιτείνουν την αγγειακή φλεγμονή [29]. Μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα φαγοκυτταρώνουν τα οξειδωμένα μόρια LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα [30]. Με παρόμοιους πιθανώς μηχανισμούς και τα λεία μυϊκά κύτταρα φαγοκυτταρώνουν και συσσωρεύουν επίσης εστέρες χοληστερόλης [31]. Τα αφρώδη κύτταρα αρχικά συσσωρεύονται μέσα στο στρώμα πρωτεογλυκάνης του έσω χιτώνα και είναι ορατά μόνο με μικροσκόπιο. Όταν συσσωρευτούν αρκετά στρώματα, είναι ορατά δια γυμνού οφθαλμού και σχηματίζουν τα ξανθώματα ή τις λιπώδεις ραβδώσεις (σχήμα 1B). Τα ξανθώματα είναι ακίνδυνα και πλήρως αναστρέψιμα αν οι παράγοντες που προκάλεσαν το σχηματισμό τους σταματήσουν να υφίστανται. Είναι παρόντα ήδη σε ορισμένες εμβρυϊκές αορτές και βρέφη κατά τους πρώτους 6 μήνες της ζωής, πιθανώς αντανakλώντας τους παράγοντες κινδύνου της μητέρας [32], αλλά ο αριθμός τους μειώνεται τα επόμενα χρόνια [33]. Στην εφηβεία, επανεμφανίζονται σε περιοχές των στεφανιαίων αρτηριών και της αορτής που είναι ευάλωτες στην αθηροσκλήρωση.

### **Ο σχηματισμός του νεκρωτικού πυρήνα**

Πολλά ξανθώματα δεν εξελίσσονται περαιτέρω, αλλά μερικά, ειδικά αυτά που σχηματίζονται σε περιοχές προτίμησης της αθηροσκλήρωσης, μετατρέπονται προοδευτικά σε αθηροσκληρωτικές βλάβες. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η συσσώρευση ακυτταρικού, πλούσιου σε λιπίδια υλικού στον έσω χιτώνα. Μικρότερες συλλογές λιπιδίων εμφανίζονται αρχικά κάτω από τα στρώματα των αφρωδών κυττάρων, χωρίς ολική διάσπαση της φυσιολογικής δομής του έσω χιτώνα [34-36]. Αυτός ο τύπος βλάβης ονομάζεται παθολογική πάχυνση του έσω χιτώνα (σχήμα 1C) και συχνά παρατηρείται στις στεφανιαίες αρτηρίες ατόμων από 20 έως 30 ετών [34, 37]. Σε ορισμένες αλλοιώσεις, οι περιχαρακωμένες συσσωρεύσεις λιπιδίων μετατρέπονται σε νεκρωτικούς πυρήνες μέσω της εισβολής μακροφάγων. Αυτή η διαδικασία διαταράσσει μη αναστρέψιμα την κανονική δομή του έσω χιτώνα και αφήνει πίσω της μια συσσώρευση λιπιδίων και κυτταρικών υπολειμμάτων [36]. Όταν υπάρχει νεκρωτικός πυρήνας, η βλάβη είναι πλέον ένα ινοαθήρωμα (εικόνα 2D).

Η απόπτωση και η δευτερεύουσα νέκρωση των αφρωδών κυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων πιστεύεται ότι είναι ένας σημαντικός μηχανισμός για την ανάπτυξη του νεκρωτικού πυρήνα [38, 39]. Επιπλέον, η παρουσία νεκρωτικών κυτταρικών υπολειμμάτων στις βλάβες, υποδεικνύει ότι η επηρεασμένη απομάκρυνση αυτών των υπολειμμάτων συμβάλλει στην ανάπτυξη του νεκρωτικού πυρήνα [40, 41].

Γιατί η νέκρωση εμφανίζεται σε ορισμένες, αλλά όχι σε άλλες αλλοιώσεις, δεν είναι γνωστό. Προφανώς, οι αιτιώδεις παράγοντες είναι τουλάχιστον μερικώς διαφορετικοί από εκείνους που προκαλούν τα ξανθώματα. Για παράδειγμα, άνδρες και γυναίκες αναπτύσσουν παρόμοιας έκτασης ξανθώματα στις στεφανιαίες αρτηρίες νωρίς στη ζωή, αλλά οι άνδρες έχουν περισσότερες προχωρημένες αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις στην ηλικία των 30 ετών [42].

### **Νεοαγγείωση και αιμορραγία της αθηρωματικής πλάκας**

Τα νεο-αγγεία, προέρχονται κυρίως από τον έξω χιτώνα των αρτηριών και παρέχουν μια εναλλακτική οδό εισόδου στις αθηροσκληρωτικές βλάβες για τα μονοκύτταρα και τα υπόλοιπα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [43]. Τα νέο-αγγεία είναι εύθραυστα και διαπερατά, επιτρέποντας την εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος και ερυθροκυττάρων [44]. Οι αιμορραγίες είναι συχνές στα ινοαθηρώματα [45] και μπορούν να επεκτείνουν τον νεκρωτικό πυρήνα και να προωθήσουν τη φλεγμονή [46]. Μια άλλη συνήθης πηγή αιμορραγίας της πλάκας είναι η εξαγγείωση του αίματος μέσω ρήξης της ινώδους κάψας [47]. Η φλεγμονώδης απόκριση σε αθηρωματικές πλάκες που έχουν αιμορραγήσει επιτείνεται σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη [48], και αυτό μπορεί να συμβάλει στην αυξημένο κίνδυνο ισχαιμικής καρδιοπάθειας [49].

### **Ίνωση και επασβέστωση**

Ο συνδετικός ιστός των αλλοιώσεων είναι αρχικά αυτός του φυσιολογικού αρτηριακού έσω χιτώνα ή της προσαρμοστικής πάχυνσης, αλλά σταδιακά αντικαθίσταται από ινώδη ιστό πλούσιο σε κολλαγόνο, ο οποίος συχνά αναπτύσσεται για να γίνει ποσοτικά το κύριο συστατικό των πλακών [50]. Ο ινώδης ιστός του νεκρωτικού πυρήνα και της ινώδους κάψας

χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε κολλαγόνο τύπου I (σχήμα 1D). Το κολλαγόνο, η ελαστίνη, και οι πρωτεογλυκάνες της ινώδους διάμεσης ουσίας παράγονται κυρίως από λεία μυϊκά κύτταρα. Τα λεία μυϊκά κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας χαρακτηρίζονται από ένα άφθονο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο και σύμπλεγμα Golgi και μόνο αραιά μιονημάτια [51]. Αυτός ο φαινότυπος των λείων μυϊκών κυττάρων έχει χαρακτηριστεί συνθετικός σε αντίθεση με τον συσταλτικό φαινότυπο. Λίγα λεία μυϊκά κύτταρα με συνθετικό φαινότυπο υπάρχουν στο φυσιολογικό αρτηριακό έσω χιτώνα, αλλά ο αριθμός τους αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των αθηρωματικών βλαβών [52], πιθανώς τόσο μέσω τοπικού πολλαπλασιασμού όσο και μέσω της μετανάστευσης από το μέσω χιτώνα και φαινοτυπικής διαφοροποίησης τους στον συνθετικό φαινότυπο. Ο αριθμός των λείων μυϊκών κυττάρων των αθηρωματικών πλακών σε όλα τα στάδια μπορεί να υποεκτιμηθεί σημαντικά επειδή πολλά συνθετικά λεία μυϊκά κύτταρα δεν περιέχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα συσταλτών πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται συνήθως για την αναγνώριση τους [53, 54]. Έχουν προταθεί και εναλλακτικές πηγές προέλευσης των λείων μυϊκών κυττάρων των αθηρωματικών πλακών, συμπεριλαμβανομένων των κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων, των υποπληθυσμών συνθετικών λείων μυϊκών κυττάρων του μέσου αρτηριακού χιτώνα ή των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων του μέσου και έξω αρτηριακού χιτώνα [55, 56], χωρίς ωστόσο το θέμα να έχει αποσαφηνισθεί πλήρως [53]. Οι ασβεστώσεις είναι συνήθεις στις αθηροσκληρωτικές βλάβες και αυξάνονται με την ηλικία. Τα αποπτωτικά κύτταρα, η εξωκυττάρια ουσία και ο νεκρωτικός πυρήνας αποτελούν πρόσφορο έδαφος για τις αρχικές μικροσκοπικές εναποθέσεις ασβεστίου, οι οποίες στη συνέχεια επεκτείνονται και σχηματίζουν μεγαλύτερες πλάκες εναποθέσεων ασβεστίου [57, 58]. Ο νεκρωτικός πυρήνας μπορεί προοδευτικά να επασβεστωθεί πλήρως και οι επασβεστώσεις μπορούν να αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του όγκου της πλάκας [52]. Σε νεκροτομικές μελέτες πολλές πλάκες αποτελούνται αποκλειστικά από ινώδη και μερικές φορές ασβεστοποιημένο ιστό χωρίς παρουσία λιπιδικής δεξαμενής ή νεκρωτικού πυρήνα. Η γένεση αυτών των ινοασβεστοποιημένων πλακών δεν είναι πλήρως κατανοητή (εικόνα 2E).



## **Αρτηριακή αναδιαμόρφωση**

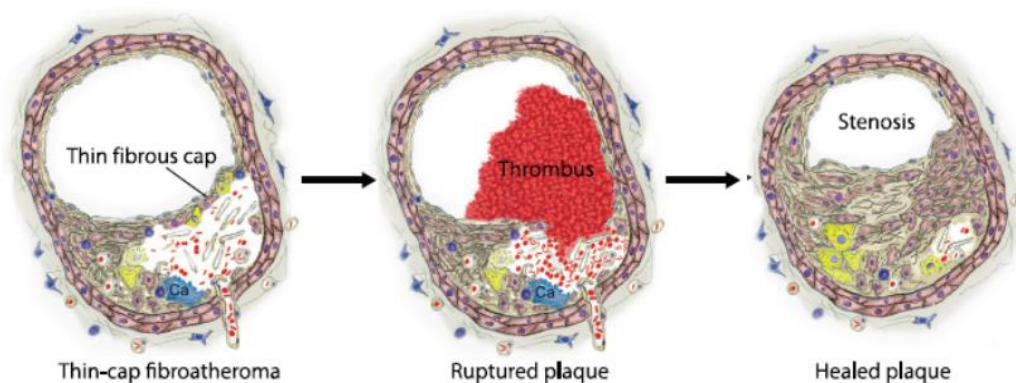
Κατά τη διάρκεια της αθηρογένεσης, το τοπικό τμήμα του αγγείου τείνει να αναδιαμορφώνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να μην προκαλείται στένωση του αυλού, συνήθως μέχρι οι πλάκες να είναι αρκετά μεγάλες (επεκτατική ή θετική αναδιαμόρφωση) [59]. Σχηματισμός στένωσης μπορεί να συμβεί μέσω συνεχούς ανάπτυξης της πλάκας ή συρρίκνωσης του τοπικού τμήματος του αγγείου (περιοριστική ή αρνητική αναδιαμόρφωση) ή με συνδυασμό των δύο διεργασιών [59, 60]. Η επεκτατική αναδιαμόρφωση παρατηρείται συχνότερα σε ινοαθηρώματα και η έκταση της διεύρυνσης του αγγείου σχετίζεται θετικά με τη φλεγμονή της πλάκας, την ατροφία του μέσου χιτώνα και το μέγεθος του νεκρωτικού πυρήνα [61, 62]. Τμήματα με περιοριστική αναδιαμόρφωση συχνά περιέχουν βλάβες πλούσιες σε ινώδη ιστό [62]. Ο τύπος και η έκταση της αναδιαμόρφωσης είναι τουλάχιστον εξίσου σημαντικές παράμετροι με το μέγεθος της πλάκας για τον καθορισμό της σοβαρότητας της στένωσης. Ως εκ τούτου, η αγγειογραφική απεικόνιση του αυλού μιας αρτηρίας δεν είναι χρήσιμη για τη διάγνωση της παρουσίας αθηροσκληρωτικής πλάκας, και αντιστρόφως, η μικροσκοπική εξέταση των πλακών δεν μπορεί να εκτιμήσει τον βαθμό της στένωσης της στένωσης του αυλού (βλ. παρακάτω).

## **Ρήξη, διάβρωση και θρόμβωση της πλάκας**

Η αθηροσκλήρωση μπορεί να παρεμποδίσει τη στεφανιαία ροή του αίματος και να προκαλέσει σταθερή στηθάγχη, η οποία σπανίως είναι θανατηφόρα ελλείψει μυοκαρδιακών ουλών, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν αρρυθμία που εκδηλώνεται ως αιφνίδιος καρδιακός θάνατος. Τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα σχεδόν πάντα προκαλούνται από θρόμβο που οφείλεται σε ξαφνική αιμορραγία της αθηροσκληρωτικής πλάκας με ή χωρίς ταυτόχρονο αγγειοσπασμό [63]. Στο έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάρση του διαστήματος ST, ο θρόμβος είναι ως επί το πλείστον αποφρακτικός και συνεχής, ενώ στην ασταθή στηθάγχη και το έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάρση του διαστήματος ST, ο θρόμβος είναι συνήθως ελλιπής και δυναμικός, ή ακόμη και απών. Επίσης, στα θύματα αιφνίδιου θανάτου από στεφανιαία νόσο, συχνά εντοπίζονται φρέσκοι ή οργανωμένοι θρόμβοι. Τα υπόλοιπα θύματα πεθαίνουν από σοβαρή στεφανιαία νόσο ελλείψει

θρόμβωσης με ή χωρίς μυοκαρδιακή ουλή [16, 63]. Σπάνιες αιτίες οξέων στεφανιαίων συνδρόμων περιλαμβάνουν εμβολή, διαχωρισμό στεφανιαίας αρτηρίας, αγγειίτιδα, κατάχρηση κοκαΐνης, μυοκαρδιακές γέφυρες και τραύμα.

Η ρήξη της πλάκας είναι η συχνότερη αιτία θρόμβωσης [63, 64]. Σε ρήξη πλάκας, ένα δομικό ελάττωμα — ένα χάσμα — στην ινώδη κάψα εκθέτει τον ιδιαίτερα θρομβογόνο πυρήνα στο αίμα (εικόνα 3). Αποσπασμένο υλικό από την πλάκα βρίσκεται μερικές φορές εντός του θρόμβου, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ρήξη και η θρόμβωση συμπίπτουν και υποστηρίζει την αιτιώδη σχέση τους. Όταν δεν μπορεί να εντοπιστεί ρήξη πλάκας παρά την ενδελεχή μικροσκοπική αναζήτηση, χρησιμοποιείται ο όρος διάβρωση της πλάκας. Ο όρος αυτός επιλέχθηκε επειδή το ενδοθήλιο συνήθως απουσιάζει κάτω από τον θρόμβο, αλλά αν αυτός είναι ο υπεύθυνος μηχανισμός παραμένει άγνωστο [16]. Τόσο η παθολογική πάχυνση του έσω χιτώνα όσο και τα ινοαθηρώματα μπορεί να επιπλακούν από διάβρωση. Η πλειονότητα των θανατηφόρων στεφανιαίων θρόμβων σχετίζεται με ρήξη πλάκας ανεξάρτητα από την κλινική εμφάνιση (οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου, αιφνίδιος θάνατος), την ηλικία και το φύλο [65].



**Εικόνα 3.** Ρήξη και επούλωση της αθηρωματικής πλάκας. Ρήξη της λεπτής κάψας ινοαθηρώματος, σχηματισμός μη αποφρακτικού θρόμβου και επακόλουθη επούλωση με σχηματισμό ινώδη ιστού και περιοριστική αναδιαμόρφωση.

Η ρήξη της πλάκας είναι επίσης το σύνηθες υπόστρωμα για τους θρόμβους που προκαλούν μη θανατηφόρο οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου [66]. Οι διαφορές μεταξύ των δύο φύλων είναι αξιοσημείωτες. Είναι ενδιαφέρον, ότι η ρήξη της πλάκας είναι ιδιαίτερα σπάνια σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι οποίες ωστόσο αποτελούν μια εξαιρετικά μικρή υποομάδα πασχόντων με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [67]. Η συχνότητα ρήξης πλάκας φαίνεται ότι είναι υψηλότερη στο έμφραγμα με ανάσπαση, από ότι χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST [68].

### **Μηχανισμοί ρήξης της πλάκας**

Ο κίνδυνος ρήξης είναι μεγαλύτερος σε έκκεντρες πλάκες με πολύ λεπτή κάψα και σημαντική διήθηση από αφρώδη κύτταρα (μακροφάγα) [64]. Σε μια νεκροτομική μελέτη αιφνίδιου καρδιακού θανάτου, το μέσο πάχος κάψας που υπέστη ρήξη βρέθηκε να είναι μόνο 23  $\mu\text{m}$  και το 95% ήταν κάτω από 65  $\mu\text{m}$  [68]. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις εισήχθη ο όρος «ινοαθηρώματα με λεπτή ινώδη κάψα» (thin-cap fibroatheromas, TCFAs) για στεφανιαίες ινοαθηρωματικές πλάκες με πάχος ινώδους κάψας < 65  $\mu\text{m}$ , που μπορεί να θεωρηθεί ότι περιλαμβάνει την πλειονότητα των πλακών σε κίνδυνο ρήξης [16]. Η εξασθένιση της ινώδους κάψας περιλαμβάνει δύο ταυτόχρονους μηχανισμούς. Ο ένας αφορά στη σταδιακή απώλεια των λείων μυϊκών κυττάρων από την ινώδη κάψα. Οι ινώδης κάψες που έχουν υποστεί ρήξη περιέχουν λιγότερα λεία μυϊκά κύτταρα και λιγότερο κολλαγόνο από τις ανέπαφες κάψες [70], και τα λεία μυϊκά κύτταρα συνήθως απουσιάζουν από την περιοχή της ρήξης [70,71]. Ταυτόχρονα, τα μακροφάγα που τη διηθούν, αποδομούν την πλούσια σε κολλαγόνο μεσοκυττάρια ουσία. Η ικανότητα των στατινών να προστατεύουν σε μικρό χρονικό διάστημα από στεφανιαία γεγονότα δείχνει ότι αυτός ο τύπος φλεγμονής οφείλεται στις λιποπρωτεΐνες.

Οι ραγείσες κάψες είναι συνήθως σε μεγάλο βαθμό διηθημένες από μακροφάγα αφρώδη κύτταρα [47, 71], που εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, καθεψίνες, και μεταλλοπρωτεϊνάσες. Εάν η λέπτυνση της ινώδους κάψας διαρκεί δεκαετίες για να εξελιχθεί ή είναι πολύ πιο δυναμική δεν είναι γνωστό. Ωστόσο, το γεγονός ότι τα ινοαθηρώματα παρατηρούνται συνήθως από την ηλικία των 30 ετών [37,

52], όπου τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα είναι εξαιρετικά σπάνια, δείχνει ότι είναι μια αργή διαδικασία.

Η ρήξη μιας λεπτής ινώδους κάψας και η επακόλουθη θρόμβωση μπορεί να εμφανιστούν αυτόματα, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις, μια προσωρινή αύξηση στο συναισθηματικό ή σωματικό στρες παρέχει την τελική ενεργοποίηση του συμβάντος. Τα αναγνωρισμένα εναύσματα περιλαμβάνουν σωματική και σεξουαλική δραστηριότητα, θυμό, άγχος, εργασιακό στρες, σεισμούς, πολέμους και τρομοκρατικές επιθέσεις, μεγάλες θερμοκρασιακές μεταβολές, λοιμώξεις και χρήση κοκαΐνης [72]. Επίσης, ο κίρκαδικός ρυθμός μπορεί να επηρεάζει την έναρξη των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων, τα οποία είναι πιο συχνά το πρωί [73]. Οι οδοί πυροδότησης μπορεί να περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, που οδηγεί σε αύξηση της καρδιακής συχνότητας και της αρτηριακής πίεσης, αυξημένη πηκτικότητα και δραστικότητα των αιμοπεταλίων [73, 74]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, παρόλο που αυτά τα εναύσματα αυξάνουν προσωρινά τον σχετικό κίνδυνο για οξέα στεφανιαία σύνδρομα σε ευαίσθητα άτομα, αυτό σημαίνει ελάχιστα για τον απόλυτο κίνδυνο, επειδή η έκθεση είναι παροδική και περιστασιακή [72]. Πιθανά, τα στεφανιαία επεισόδια συχνά θα είχαν συμβεί ούτως ή άλλως ελλείψει εναυσμάτων μέσα σε λίγες εβδομάδες [75].

### **Μηχανισμοί διάβρωσης της πλάκας**

Ο μηχανισμός που οδηγεί σε θρόμβωση χωρίς ρήξη παραμένει ακόμη ανεπαρκώς διευκρινισμένος. Το ενδοθήλιο κάτω από την επιφάνεια του θρόμβου συνήθως απουσιάζει, αλλά δεν έχουν εντοπιστεί διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά της υποκείμενης πλάκας. Οι διαβρωμένες και θρομβωμένες πλάκες που προκαλούν αιφνίδιο καρδιακό θάνατο είναι συνήθως ελάχιστα ασβεστοποιημένες, συχνά συνδέονται με αρνητική αναδιαμόρφωση και φλεγμαίνουν λιγότερο από τις ραγείς πλάκες [16, 76]. Έχει επίσης αναφερθεί εστιασμένη φλεγμονή αμέσως κάτω από τον υπερκείμενο θρόμβο [16, 71]. Με αυτή την υπόθεση συνάδει η παρατήρηση ότι οι βλάβες που έχουν υποστεί διάβρωση της πλάκας συνήθως εμφανίζουν ανέπαφους τον εσωτερικό και εξωτερικό ελαστικό υμένα και ένα καλά ανεπτυγμένο μέσο χιτώνα με συσταλτικά λεία μυϊκά κύτταρα, σε αντίθεση με τις ραγείς πλάκες

όπου συχνά διαταράσσεται ο εσωτερικός ελαστικός υμένας και ο υποκείμενος μέσος χιτώνας είναι λεπτός και αποδιοργανωμένος [77]. Μόνο μια μειοψηφία ρήξεων οδηγεί σε κλινικά συμπτώματα, ενώ οι υπόλοιποι επουλώνονται σιωπηλά με τη δημιουργία τοιχωματικού θρόμβου [78-80]. Υποθετικά, απώλεια των αντιθρομβωτικών ιδιοτήτων της επιφάνειας της πλάκας, η οποία στην ακραία εκδοχή της παρουσιάζεται ως διάβρωση της πλάκας, θα μπορούσε να είναι καθοριστικός παράγοντας, μαζί με κυκλοφορούντες θρομβογόνους παράγοντες.

### **Θρόμβωση**

Το μέγεθος της θρομβωτικής απόκρισης στη ρήξη ή τη διάβρωση μιας αθηρωματικής πλάκας ποικίλλει εξαιρετικά, και μόνο περιστασιακά εξελίσσεται σε σημαντικό και απειλητικό για τη ζωή θρόμβο. Πιθανώς οι καθοριστικοί παράγοντες είναι αυτοί της κλασικής Τριάδας του Virchow: (1) θρομβογονικότητα των εκτιθέμενων υλικών της πλάκας, (2) διαταραχές της τοπικής ροής και (3) συστηματική θρομβωτική τάση. Το κάπνισμα προδιαθέτει σε οξέα στεφανιαία σύνδρομα τουλάχιστον εν μέρει μέσω της αύξησης της συστηματικής θρομβωτικής τάσης [69, 81]. Με τη ρήξη της πλάκας, το κολλαγόνο της κάψας, ο εξαιρετικά θρομβογόνος λιπιδικός πυρήνας, και ο ιστικός παράγοντας εκτίθενται στην κυκλοφορία [82, 83]. Η διάβρωση της πλάκας είναι μάλλον ένα ασθενέστερο θρομβογόνος ερέθισμα. Ως συνέπεια, οι θανάσιμοι θρόμβοι που συνδέονται με τη διάβρωση της πλάκας απαιτούν περισσότερο χρόνο για να συντεθούν από ότι συμβαίνει με τη ρήξη [76]. Η χρονική διάρκεια από τη ρήξη της πλάκας μέχρι την έναρξη του συνδρόμου δεν μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί, επειδή η ρήξη από μόνη της είναι ασυμπτωματική και η ακόλουθη θρομβωτική διαδικασία είναι εξαιρετικά απρόβλεπτη. Το υλικό της πλάκας βρίσκεται μερικές φορές εντός του θρόμβου [47, 71], υποδεικνύοντας ότι η σοβαρή θρόμβωση ακολουθήσε αμέσως μετά τη ρήξη της πλάκας. Σε άλλες περιπτώσεις, η θρομβωτική ανταπόκριση είναι δυναμική: η θρόμβωση και η θρομβόλυση, που συχνά συνδέονται με αγγειοσπασμό, τείνουν να εμφανίζονται ταυτόχρονα προκαλώντας διαλείπουσα ροή και το σχηματισμό ενός θρόμβου κατά στρώματα, που αναπτύσσεται μέσα σε ημέρες [86]. Θρόμβοι που λαμβάνονται με θρομβεκτομή ή εξετάζονται μεταθανάτια μπορεί εν μέρει να έχουν εκφυλιστεί ή οργανωθεί, υποδεικνύοντας ότι

ξεκίνησαν αρκετές ημέρες έως και μία εβδομάδα πριν από την εκδήλωση του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου [76, 85]. Είναι πιθανό ότι ο θρόμβος κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, μπορεί να οδηγήσει σε ενδοθηλιακή απογύμνωση, διήθηση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων/μακροφάγων στο υποκείμενο αγγειακό τοίχωμα, όπως στη φλεγμονή της φλεβικής θρόμβωσης [86]. Αν η ροή του αίματος συνεχίζεται πάνω από την υπεύθυνη βλάβη, μικροέμβολα από το υλικό της πλάκας και του θρόμβου μπορεί να αποκολληθούν, οδηγώντας σε περιφερικό εμβολισμό στο μυοκάρδιο [84, 87]. Η εμβολή αυτή έχει αναφερθεί ότι είναι συχνότερη σε διαβρώσεις (74%) από ότι σε ρήξεις (40%), σε άτομα που παρουσιάζουν αιφνίδιο καρδιακό θάνατο, χωρίς προηγούμενη ενδοστεφανιαία παρέμβαση [86, 87]. Η περιφερική εμβολή από οποιαδήποτε από τις δύο πηγές μπορεί να προκαλέσει μικροαγγειακή απόφραξη που αποτρέπει την αποκατάσταση της μυοκαρδιακής άρδευσης παρά την επανασηραγγοποίηση της υπεύθυνης για το έμφραγμα στεφανιαίας αρτηρίας.

### **Η επούλωση της πλάκας**

Ένα ειδικό μη ομοιόμορφο μοτίβο πυκνού τύπου I (παλαιότερο) και χαλαρά διευθετημένου τύπου III (νεότερο) κολλαγόνο, που θεωρείται ενδεικτικό επουλωμένης ρήξης πλάκας, παρατηρείται σε πολλές στεφανιαίες πλάκες, ιδιαίτερα σε εκείνες που προκαλούν χρόνια υψηλού βαθμού στένωση [79]. Συχνά υπάρχουν αρκετές επουλωμένες περιοχές ρήξης και ο αριθμός των επουλωμένων ρήξεων σχετίζεται με τη σοβαρότητα της στένωσης [80]. Άλλες πλάκες μπορεί να έχουν πολυεπίπεδη εμφάνιση ενδεικτική της σταδιακής ενσωμάτωσης και οργάνωσης του θρόμβου σε διαβρωμένες πλάκες [16]. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι οι σιωπηρές ρήξεις και οι διαβρώσεις των πλακών είναι σημαντικές για την αύξηση της πλάκας και το σχηματισμό χρόνιας στένωσης (σχήμα 3). Επιπλέον, ο σχηματισμός ουλής έχει προταθεί ως η αιτία της περιοριστικής αγγειακής αναδιαμόρφωσης που παρατηρείται συχνά σε σοβαρά στενωτικές βλάβες [62, 89]. Ο κεντρικός ρόλος της επούλωσης της πλάκας στο σχηματισμό της στένωσης μπορεί να εξηγήσει γιατί οι χρόνιες στενώσεις αναπτύσσονται συχνά με ένα φασικό και όχι γραμμικό τρόπο, σε περιοχές όπου σε μια προηγούμενη αγγειογραφία υπήρχαν ασήμαντες στενώσεις [79, 90].

## **Το συνολικό αθηρωματικό φορτίο**

Στην έρευνα και την κλινική πράξη, υπάρχει ανάγκη να χαρακτηρίσουμε την αθηροσκλήρωση ή τις μεμονωμένες πλάκες για μερικά σημαντικά και μετρήσιμα χαρακτηριστικά τους, που αποδίδουν την κατάσταση της νόσου και τον κίνδυνο εξέλιξης. Τέτοιες μεταβλητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τελικά σημεία για κλινικές δοκιμές και ως εργαλεία πρόβλεψης κινδύνου για να καθοδηγήσουν τις θεραπευτικές αποφάσεις. Μερικοί από τους όρους που χρησιμοποιούνται σε αυτόν τον τομέα είναι το φορτίο των αθηρωματικών πλακών, η δραστηριότητα και η ευαλωτότητα. Το φορτίο είναι ένα μέτρο της έκτασης της αθηροσκλήρωσης στο σώμα ή σε ένα συγκεκριμένο αγγειακό δίκτυο ανεξάρτητα από την κυτταρική σύνθεση και τη δραστηριότητα των πλακών. Μπορεί να μετρηθεί ως όγκος πλάκας, αρτηριακή επιφάνεια που καλύπτεται με βλάβες, ή με κάποιο σχετικό δείκτη, όπως ο υπολογισμός του δείκτη ασβεστίου με υπολογιστική τομογραφία, το πάχος έσω - μέσου χιτώνα και η επιφάνεια της πλάκας στην καρωτιδική περιοχή με υπερηχογραφία, και ο Κνημο – Βραχιόνιος Δείκτης πίεσης στην περιφερική αρτηριακή νόσο. Επειδή η αθηροσκλήρωση είναι μια πολυεστιακή νόσος που επηρεάζει ολόκληρο το αρτηριακό δίκτυο, υψηλό φορτίο σε μια περιοχή, για παράδειγμα, στις καρωτίδες ή στα κάτω άκρα, μπορεί επίσης να είναι δείκτης για προχωρημένη νόσο αλλού, ειδικά στις στεφανιαίες αρτηρίες [37, 91-93]. Έτσι, η παρουσία μιας καρωτιδικής στένωσης που ανιχνεύθηκε από υπερηχογραφικά ή περιφερική αγγειακή νόσος που ανιχνεύεται από ένα χαμηλό κνημοβραχιόνιο δείκτη, ενέχει κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου συγκρίσιμο με εκείνο των ασθενών με γνωστή ισχαιμική καρδιοπάθεια και, ως εκ τούτου, αντιμετωπίζονται ως ισοδύναμα ισχαιμικής καρδιοπάθειας [94]. Λόγω της σύνθεσης τους και της βραδείας εξέλιξης των πλακών το φορτίο αλλάζει αργά και σε περιορισμένο βαθμό ακόμη και με θεραπείες που μειώνουν σημαντικά τον κίνδυνο οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [95]. Από τα συστατικά των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων, τα λιπίδια και τα μακροφάγα φαίνεται ότι είναι πιο πιθανό να υποστραφούν [96, 97].

## **Δραστηριότητα της πλάκας**

Η δραστηριότητα της ασθένειας συνολικά ή των μεμονωμένων πλακών είναι μια σημαντική, αλλά δύσκολα εφαρμόσιμη έννοια, η οποία όμως ενδεχομένως θα μπορούσε να ανοίξει το δρόμο για προληπτική θεραπεία στα πρώιμα στάδια της νόσου, όπου η νόσος είναι πιο τροποποιήσιμη. Η δραστηριότητα της νόσου ή της πλάκας δεν είναι μια απλή, σαφώς καθορισμένη έννοια. Συχνά εκλαμβάνεται ως φλεγμονή, μετρούμενη ως η πυκνότητα των μακροφάγων εντός της πλάκας. Αυτό είναι εύλογο δεδομένου του κεντρικού ρόλου της αγγειακής φλεγμονής στην ανάπτυξη πλάκας.

Ωστόσο, υπάρχει θεμελιώδης διαφορά μεταξύ της φλεγμονής μιας πρώιμης αθηροσκληρωτικής βλάβης και της εστιακής φλεγμονής της ινώδους κάψας που μπορεί να οδηγήσει σε ρήξη και θρόμβωση [98]. Αρκετές άλλες διεργασίες σε αθηροσκληρωτικές πλάκες θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν κάτω από τον τίτλο της δραστηριότητας της πλάκας, συμπεριλαμβανομένης της νέκρωσης του έσω χιτώνα, που αποτελεί ίσως την πιο επιζήμια δραστηριότητα της νόσου. Η αγγειογένεση, η αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου και η αιμορραγία της πλάκας συχνά συνοδεύουν τη φλεγμονή και αποτελούν άλλους πιθανούς δείκτες της δραστηριότητας της νόσου.

## **Ευαλωτότητα της πλάκας**

Για να προβλέψουμε ποιες πλάκες κινδυνεύουν να οδηγήσουν σε θρόμβωση και να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που οδηγούν στο σχηματισμό τους, γίνεται μεγάλη προσπάθεια για την αναγνώριση των παθολογικών χαρακτηριστικών των ευάλωτων ή συνώνυμα των επιρρεπών σε θρόμβωση ή υψηλού κινδύνου πλακών [99]. Ειδικότερα, η παρουσία θρόμβωσης δεν είναι η ίδια με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Όπως συζητήθηκε προηγούμενα, πολλές, ίσως η πλειοψηφία, των ρήξεων και διαβρώσεων είναι ασυμπτωματικές βραχυπρόθεσμα, αν και μερικές φορές μπορεί να οδηγήσουν σε σταδιακή στένωση της στεφανιαίας αρτηρίας [78-80]. Ο ευάλωτος ασθενής είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον ασθενή σε υψηλό βραχυπρόθεσμο κίνδυνο εκδήλωσης οξέος κλινικού επεισοδίου [100]. Αυτό εξαρτάται από το φορτίο, την ευαλωτότητα της πλάκας, τη συστηματική θρομβωτική τάση και την ευαισθησία του μυοκαρδίου σε



ισχαιμία και αρρυθμίες. Η ευάλωτη πλάκα χρησιμοποιείται μερικές φορές ως μια έννοια που περιλαμβάνει πλάκες σε υψηλό κίνδυνο θρόμβωσης με οποιονδήποτε μηχανισμό (ρήξη, διάβρωση) και μερικές φορές για να περιγράψει ένα σύνολο ιστολογικών χαρακτηριστικών που θεωρείται ότι αυξάνουν τον κίνδυνο επικείμενης ρήξης και θρόμβωσης. Ο πίνακας 1 περιγράφει τα χαρακτηριστικά που ανευρίσκονται σε ραγείσες πλάκες σε νεκροτομικές μελέτες. Τα ίδια χαρακτηριστικά θεωρείται ότι χαρακτηρίζουν τις ευάλωτες πλάκες. Η τυπική πλάκα που είναι επιρρεπής στη ρήξη είναι ένα ινοαθήρωμα με λεπτή κάψα (TCFA), με μεγάλο νεκρωτικό πυρήνα και διήθηση μακροφάγων στην κάψα [64, 70]. Άλλα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν μεγάλο μέγεθος πλάκας, επεκτατική αναδιαμόρφωση (ήπια στένωση αγγειογραφικά), νεοαγγείωση, αιμορραγία, φλεγμονή του έξω χιτώνα, και διάστικτες επασβεστώσεις [98].

**Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά Ραγείσας Πλάκας\***

---

Θρόμβος

Μεγάλος νεκρωτικός πυρήνας

Λεπτή ινώδης κάψα (συνήθως <65μm)

Υψηλή συγκέντρωση μακροφάγων

Λίγα λεία μυϊκά κύτταρα

Επεκτατική αρτηριακή αναδιαμόρφωση, χωρίς σημαντική στένωση

Νεοαγγείωση

Αιμορραγία

Περιαγγειακή φλεγμονή (έξω χιτώνα)

Διάστικτη επασβεστώση

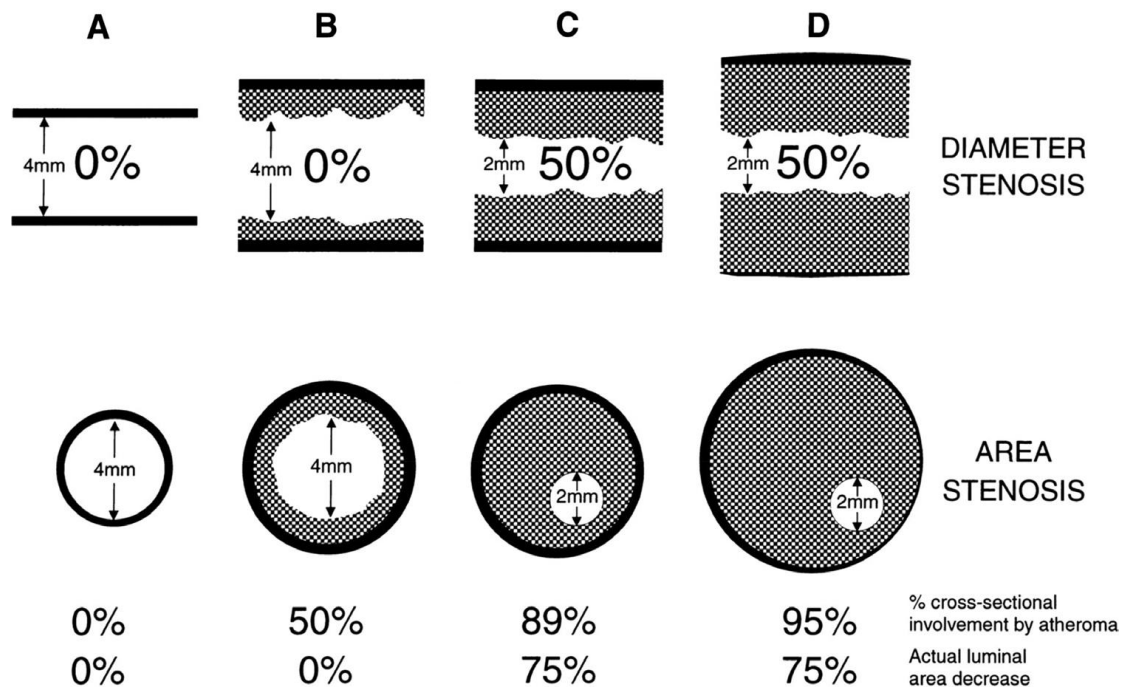
---

\*Τα ίδια στοιχεία, εκτός από τη ρήξη της κάψας και τον ενδοαυλικό θρόμβο, υποθέτουμε ότι χαρακτηρίζουν τις ευάλωτες πλάκες.

### **Το μέγεθος της πλάκας και η σοβαρότητα της στένωσης**

Αγγειογραφικές μελέτες έδειξαν ότι οι πλάκες που προκαλούν στένωση έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να προκαλέσουν κλινικό επεισόδιο [65, 102]. Ωστόσο, τα περισσότερα οξέα στεφανιαία σύνδρομα προκαλούνται από

πλάκες που δεν προκαλούν σημαντική στένωση σε αγγειογραφία που διενεργήθηκε εβδομάδες ή μήνες πριν, επειδή αυτές οι πλάκες είναι περισσότερες από τις λίγες σοβαρά στενωτικές πλάκες, ακόμη και αν παρουσιάζουν χαμηλότερη ευαλωτότητα [64, 101]. Η προϋπάρχουσα ήπια στένωση σε αυτές τις περιπτώσεις εξηγείται από τη σημαντικού βαθμού επεκτατική αναδιαμόρφωση, επειδή οι ραγείσες πλάκες είναι κατά μέσο όρο μεγάλες [101, 102]. Πρόσφατες μελέτες έχουν περιγράψει σημαντική αγγειογραφική στένωση τις ημέρες πριν από το έμφραγμα του μυοκαρδίου [103]. Επιπλέον, δεδομένα από νεκροψίες δείχνουν ότι τα ινοαθηρώματα με λεπτή κάψα είναι μικρότερα από τις ραγείσες πλάκες, οι οποίες είναι σχεδόν πάντοτε μεγάλες και σοβαρά αποφρακτικές [105]. Οι παρατηρήσεις αυτές αμφισβήτησαν τη μακροχρόνια αντίληψη ότι οι ήπιες έως μέτριες αποφρακτικές στεφανιαίες βλάβες ευθύνονται για την πλειονότητα των εμφραγμάτων [104, 106]. Μπορεί, ωστόσο, να μην προκαλεί έκπληξη το ότι μια αγγειογραφική εξέταση άμεσα μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου μπορεί να αποκαλύψει σοβαρή στεφανιαία βλάβη ή ότι το μέγεθος μιας ραγείσας πλάκας υπερβαίνει εκείνο της πρόδρομης της. Αυτό συμβαίνει γιατί η ρήξη της πλάκας ακολουθείται όχι μόνο από δυναμική ενδοαυλική θρόμβωση ( $\pm$  αγγειοσπασμό), αλλά και από αιμορραγία από τον αυλό στην πλάκα μέσω της ρήξης (αιμορραγία στο νεκρωτικό πυρήνα από τα τροφοφόρα αγγεία, μπορεί να έχει προηγηθεί της ρήξης) [65], προκαλώντας ταχέως η επέκταση της πλάκας που δεν ανταποκρίνεται στη θρομβόλυση και τη θρομβεκτομή [85]. Επιπλέον, είναι σημαντικό να θεωρηθεί ότι η στένωση του αυλού σε τομές παραφίνης παθολογοανατομικών παρασκευασμάτων, δεν ισοδυναμεί με τη στένωση που προσδιορίζεται αγγειογραφικά, λόγω της αρτηριακής αναδιαμόρφωσης, του διαφορετικού τρόπου υπολογισμού και της συρρίκνωσης του ιστού από τη μονιμοποίηση και την αφυδάτωση (εικόνα 4) [101].



**Εικόνα 4.** Επάνω σειρά, σχηματικές αγγειογραφικές εικόνες. Τα παραδείγματα A – D δείχνουν πως η αγγειογραφία δεν είναι αρκετά ακριβής μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας και του μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας εξαιτίας της αρτηριακής αναδιαμόρφωσης. Κάτω σειρά, σχηματικές εικόνες διατομής των ίδιων αγγείων. Τα ίδια τμήματα στο μικροσκόπιο δείχνουν πως ο βαθμός της στένωσης του αυλού δεν μπορεί να καθορισθεί εξαιτίας της αρτηριακής αναδιαμόρφωσης.

### Άλλα χαρακτηριστικά της ευάλωτης πλάκας

Επιπλέον χαρακτηριστικά που ανευρίσκονται πιο συχνά σε ραγείσες πλάκες από ό, τι σε ανέπαφες πλάκες, περιλαμβάνουν την αυξημένη νεοαγγείωση και τη φλεγμονή του έξω χιτώνα [107, 108]. Οι ένοχες βλάβες των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων είναι γενικά λιγότερο ασβεστοποιημένες από τις πλάκες που είναι υπεύθυνες για σταθερή στηθάγχη και το μοτίβο της ασβεστοποίησης διαφέρει [109, 110]. Αυτά τα χαρακτηριστικά δεν συνδέονται ανεξάρτητα με τη ρήξη της πλάκας, ωστόσο η σημασία τους έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να αποτελούν στόχοι για τη μη επεμβατική απεικόνιση.

Το ενδοθήλιο των αγγείων αποτελεί την ενδότερη στιβάδα του αγγειακού τοιχώματος που έρχεται σε συνεχή επαφή και αλληλεπίδραση με το κυκλοφορούν αίμα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία και στη φυσιολογική λειτουργία της αιμάτωσης των οργάνων. Η επίδραση βιοχημικών

και μηχανικών ερεθισμάτων στο ενδοθήλιο προκαλεί την παραγωγή διαφόρων βιολογικών παραγόντων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι βιολογικοί αυτοί παράγοντες ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο, επηρεάζουν τη φλεγμονή, τη θρόμβωση, καθώς και την αγγειακή αύξηση. Η φυσιολογική ενδοθηλιακή λειτουργία εξασφαλίζει ένα αντιαθηρογόνο περιβάλλον, αναστέλλει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων και των λεμφοκυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, προλαμβάνει τον αγγειόσπασμο και, τέλος, προάγει την ινωδόλυση. Σε καταστάσεις όπου οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί μεταβάλλονται, οι αλλοιώσεις που συμβαίνουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγουν ένα αγγειοσυσπαστικό, προθρομβωτικό και προφλεγμονώδες περιβάλλον και διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία και στις κλινικές εκδηλώσεις της καρδιαγγειακής νόσου.

**1.1.6 Παράγοντες Κινδύνου:** Παρά τη σημαντική εξέλιξη στην κατανόηση, διάγνωση και αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών παθήσεων, εξακολουθούν να παραμένουν σημαντικά κενά και μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ίαση για καμιά μορφή καρδιοπάθειας. Ωστόσο, η συνεχιζόμενη έρευνα οδηγεί σε νέα ευρήματα, που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αποτελεσματικότερες θεραπείες στο μέλλον. Στοιχεία από τη μελέτη πληθυσμών, όπως αυτά που προέρχονται από την μελέτη Framingham Heart Study, παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τους παράγοντες κινδύνου που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου και της ισχαιμικής καρδιοπάθειας και του τρόπου που αναπτύσσονται και εξελίσσονται επειδή τα δεδομένα αυτά επηρεάζονται λιγότερο από την αναπόφευκτη προκατάληψη επιλογής (selection bias) των δεδομένων από κλινικές μελέτες. Επιπλέον, τα επιδημιολογικά δεδομένα παρέχουν κρίσιμες πληροφορίες σχετικά με τις μεθόδους, τους στόχους και τα αποτελέσματα της πρωτογενούς και δευτερογενούς πρόληψης της στεφανιαίας νόσου.

Η έννοια «παράγοντες κινδύνου» στην στεφανιαία νόσο επινοήθηκε για πρώτη φορά από την μελέτη Framingham Heart Study (FHS), που δημοσίευσε τα αρχικά συμπεράσματά της το 1957. Η FHS κατέδειξε την επιδημιολογική σχέση του καπνίσματος, των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης και της

χοληστερόλης με τη συχνότητα εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου. Η κατανόηση των παραγόντων αυτών είναι κρίσιμης σημασίας για την πρόληψη της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Τα ευρήματα ήταν αληθινά επαναστατικά γιατί επέφεραν σημαντικές αλλαγές στον τρόπο που ασκείται η σύγχρονη ιατρική [111].

Οι παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο διακρίνονται σε κλασσικούς και νεότερους, καθώς και σε τροποποιήσιμους και μη τροποποιήσιμους [112]:

#### **α. Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου:**

##### **Μη τροποποιήσιμοι:**

- Ηλικία: μεγαλύτερη των 45 ετών στους άνδρες και μεγαλύτερη των 55 ετών στις γυναίκες
- Οικογενειακό ιστορικό πρόωρης στεφανιαίας νόσου: περιλαμβάνει διάγνωση ΣΝ σε πατέρα ή αδελφό πριν από την ηλικία των 55 ετών και σε μητέρα ή αδελφή πριν από την ηλικία των 65 ετών [113].
- Φυλή: μεταξύ των ατόμων με ισχαιμική καρδιοπάθεια, το ποσοστό καρδιαγγειακής θνησιμότητας για τους αφροαμερικανούς είναι ιδιαίτερα υψηλό· στους Ασιάτες, χαμηλά επίπεδα υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών χοληστερόλης (HDL-C), που θεωρούνται παράγοντας κινδύνου στεφανιαίας νόσου, είναι ιδιαίτερα συχνά· επίσης οι Νότιο-Ασιάτες εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου [114 - 116].

##### **Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου**

Πολλοί παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο (CAD) συνδέονται με τον τρόπο ζωής και η πρόληψη της στοχεύει στην τροποποίηση ειδικών παραγόντων [112]. Ένας αυξανόμενος αριθμός προστατευτικών παραγόντων που αφορούν στον τρόπο ζωής έχουν συσχετιστεί με μια αξιοσημείωτη μείωση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο, εγκεφαλική αγγειακή νόσο και τη συνολική καρδιαγγειακή θνησιμότητα σε άνδρες και γυναίκες. Οι

προστατευτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν διατροφικές συνήθειες, τη σωματική δραστηριότητα, την κατανάλωση αλκοόλ, τις συνήθειες ύπνου, και καπνίσματος και το δείκτη μάζας σώματος [117].



**Εικόνα 5.** Κλασικοί έναντι νεότερων παραγόντων κινδύνου για στεφανιαία νόσο (CAD). Ο αυξανόμενος κατάλογος των νεότερων βιολογικών δεικτών αντισταθμίζεται από τους κλασσικούς παράγοντες κινδύνου στην πρόβλεψη μελλοντικών καρδιαγγειακών επεισοδίων και προσθέτει ελάχιστα στην προγνωστική αξία των παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου. BNP=B-τύπου νατριουρητικό πεπτίδιο, BP=αρτηριακή πίεση, CRP=C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, HDL=υψηλής πυκνότητας χοληστερόλη, HIV=ιός ανοσολογικής ανεπάρκειας του ανθρώπου λοίμωξη.

**Υπερχοληστερολαιμία:** Τα αποτελέσματα της μελέτης Framingham Heart Study έδειξαν ότι όσο υψηλότερο το επίπεδο χοληστερόλης, τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος της στεφανιαίας νόσου (ΣΝ). Αντιστρόφως η ΣΝ δεν ήταν συχνή σε άτομα με επίπεδα χοληστερόλης κάτω από 150 mg/dL. Το 1984, η Lipid Research Clinics–Coronary Primary Prevention Trial αποκάλυψε ότι η μείωση της ολικής και της LDL χοληστερόλης οδηγεί σε σημαντική μείωση της ΣΝ. Σειρά πιο πρόσφατων κλινικών δοκιμών με στατίνες έχουν παράσχει πειστικά στοιχεία ότι η μείωση της LDL χοληστερόλης μειώνει το ποσοστό του εμφράγματος του μυοκαρδίου, την ανάγκη για διαδερμικές παρεμβάσεις στα στεφανιαία και τη θνησιμότητα που συνδέεται με τη ΣΝ [124].

**Αρτηριακή υπέρταση:** Από τους 50 εκατομμύρια Αμερικανούς με αρτηριακή υπέρταση, σχεδόν το ένα τρίτο διαφεύγουν της διάγνωσης και μόνο το ένα τέταρτο λαμβάνουν αποτελεσματική θεραπεία [119]. Στη μελέτη Framingham Heart Study, ακόμη και η υψηλή-φυσιολογική αρτηριακή πίεση (ορίζεται ως συστολική πίεση 130-139 mmHg, διαστολική αρτηριακή πίεση 85-89 mmHg, ή και τα δύο) διπλασιάζει τον κίνδυνο της καρδιαγγειακής νόσου, σε σύγκριση με υγιή άτομα [120] .

Αύξηση της αρτηριακής πίεσης σε άτομα μέσης ηλικίας οδηγεί σε υψηλότερο υπολειπόμενο καρδιαγγειακό κίνδυνο, ενώ το αντίστροφο συμβαίνει με τη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Αυτό υποδηλώνει ότι οι προσπάθειες πρόληψης πρέπει να συνεχίσουν να στοχεύουν στη μείωση της αρτηριακής πίεσης προκειμένου να αποφευχθεί η υπέρταση [121]. Στην κατεύθυνση αυτή θεωρούνται ότι συμβάλουν σημαντικά ο έλεγχος του σωματικού βάρους, η υιοθέτηση διατροφής πτωχής σε νάτριο και πλούσιας σε κάλιο (δίαιτα DASH), ο περιορισμός της κατανάλωσης αλκοόλ σε λιγότερο από 2 ποτά την ημέρα και η αυξημένη φυσική δραστηριότητα [119].

Μια μετα-ανάλυση έδειξε ότι η Μεσογειακή διατροφή είχε ευνοϊκότερη επίδραση στο σωματικό βάρος, το δείκτη μάζας σώματος, τη συστολική αρτηριακή πίεση, τη διαστολική αρτηριακή πίεση, γλυκόζη νηστείας πλάσματος, την ολική χοληστερόλη, και την υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσα πρωτεΐνη από δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά [122].

Η υπέρταση, μαζί με άλλους παράγοντες όπως η παχυσαρκία, συμβάλλει στην ανάπτυξη της υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας, η οποία έχει βρεθεί ότι αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνησιμότητας, διπλασιάζοντας σχεδόν τον κίνδυνο καρδιαγγειακού θανάτου σε άνδρες και γυναίκες [123].

**Κάπνισμα:** Η διακοπή του καπνίσματος αποτελεί το σημαντικότερο μέτρο πρόληψης της ΣΝ. Ήδη από τη δεκαετία του 1950, μελέτες ανέφεραν μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης στο κάπνισμα τσιγάρου και των καρδιακών παθήσεων. Άτομα τα οποία καταναλώνουν περισσότερα από 20 τσιγάρα καθημερινά έχουν 2-3 φορές αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιακής νόσου σχετικά με τους μη καπνιστές. Συνέχιση του καπνίσματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για επαναλαμβανόμενα ισχαιμικά καρδιακά επεισόδια [124].

Το κάπνισμα αποτελεί παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο τόσο για στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Ωστόσο, σε ορισμένες χώρες, το κάπνισμα στις γυναίκες παρουσιάζει αυξητικές τάσεις [125].

**Σακχαρώδης διαβήτης:** Εκτιμάται ότι 20.8 εκατομμύρια άνθρωποι στις Ηνωμένες Πολιτείες (7% του πληθυσμού) έχουν διαβήτη και από αυτούς περίπου 6,2 εκατομμύρια παραμένουν αδιάγνωστοι. Οι ασθενείς με διαβήτη είναι τουλάχιστο 2 έως 3 φορές πιο πιθανό να εμφανίσουν καρδιαγγειακά επεισόδια απ' ότι συνομήλικα άτομα κοινής φυλετικής προέλευσης, χωρίς διαβήτη [126] και έχει φανεί ότι τα επίπεδα της HbA1c σχετίζονται με τον κίνδυνο ΣΝ τόσο σε διαβητικούς όσο και σε μη διαβητικούς άνδρες και γυναίκες [127].

**Παχυσαρκία:** Η παχυσαρκία συνδέεται με δυσανεξία στη γλυκόζη, αντίσταση στην ινσουλίνη, υπέρταση, έλλειψη σωματικής δραστηριότητας, δυσλιπιδαιμία και αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο [128, 129]. Ασθενείς οι οποίοι είναι εξαιρετικά παχύσαρκοι (δείκτης μάζας σώματος [ΔΜΣ]>40) παρουσιάζουν έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάρπασση του ST διαστήματος (STEMI) σε νεαρότερη ηλικία και έχουν αυξημένη ενδονοσοκομειακή θνησιμότητα, παρότι έχουν λιγότερο εκτεταμένη στεφανιαία νόσο και καλύτερη λειτουργία της αριστερής κοιλίας [130]. Ηλικιωμένοι ασθενείς με ΣΝ και



φυσιολογικό βάρος αλλά κεντρική παχυσαρκία, όπως καθορίζεται από την αναλογία περιφέρειας μέσης-γοφών, είτε την περιφέρεια μέσης εμφανίζουν υψηλό κίνδυνο θανάτου [131].

**Έλλειψη σωματικής δραστηριότητας:** Τα καρδιοπροστατευτικά οφέλη της άσκησης περιλαμβάνουν τη μείωση του λιπώδους ιστού και της παχυσαρκίας, μείωση της αρτηριακής πίεσης, των λιπιδίων του ορού και της αγγειακής φλεγμονής, βελτίωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και βελτίωση της ενδογενούς ινωδόλυσης [132]. Επιπλέον, τακτική άσκηση μειώνει τις απαιτήσεις του μυοκαρδίου σε οξυγόνο, αυξάνει την ικανότητα άσκησης και μεταφράζεται σε μείωση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου. Στη μελέτη Women's Health Initiative, ζωηρό βάδισμα για 30 λεπτά 5 φορές την εβδομάδα συνδέεται με 30% μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων κατά τη διάρκεια μιας περιόδου παρακολούθησης 3,5 ετών [133]. Μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι ακόμη και 15 λεπτά την ημέρα ή 90 λεπτά την εβδομάδα μέτριας έντασης άσκηση μπορεί να είναι ευεργετική [41 134]. Η τήρηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής συνδέεται με χαμηλό κίνδυνο αιφνίδιου καρδιακού θανάτου στις γυναίκες [135].

Σε μια προοπτική μελέτη που αξιολόγησε τη φυσική κατάσταση (με δοκιμασία κοπώσεως) και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σε νεαρούς ενήλικες ηλικίας 18-30 ετών, μετά από διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 26.9 ετών, βρέθηκε ότι υψηλότερο επίπεδο φυσικής κατάστασης κατά την αρχική επίσκεψη της μελέτης και βελτίωση της φυσικής κατάστασης νωρίς στην ενήλικη ζωή, συνδέονται με μικρότερο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και θανάτου [136]. Επιπλέον, η αρχική φυσική κατάσταση και οι αλλαγές στη φυσική κατάσταση συσχετίζονται με μυοκαρδιακή υπερτροφία και δυσλειτουργία, αλλά όχι με την επασβέστωση των στεφανιαίων αρτηριών. Τέλος στοιχεία δείχνουν ότι η ψυχαγωγία μπροστά σε οθόνη (όπως η τηλεόραση) αυξάνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, ανεξάρτητα από τη σωματική δραστηριότητα [137]. Η σχέση μεταξύ φλεγμονής και μεταβολικών παραγόντων κινδύνου μπορεί να εξηγήσει εν μέρει αυτή τη σχέση.

**Μεταβολικό σύνδρομο:** Το μεταβολικό σύνδρομο περιλαμβάνει ομάδα παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο για ισχαιμική καρδιοπάθεια και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Στη μελέτη Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor, ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο είχαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά στεφανιαίας, καρδιαγγειακής, και συνολικής θνησιμότητας [138].

Η διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου προϋποθέτει τη συνύπαρξη 3 από τις παρακάτω 5 καταστάσεις, όπως ορίζονται από το American Heart Association / National Heart Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI) Cholesterol Education Program (CEP) [139]:

- Αυξημένη περίμετρος μέσης: >102cm για τους άνδρες και >88cm για τις γυναίκες
- Αυξημένα τριγλυκερίδια ορού: >150mg/dL ή λήψη φαρμακευτικής αγωγής για αυξημένα τριγλυκερίδια
- Χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης: <40 mg/dL στους άνδρες και < 50 mg/dL στις γυναίκες
- Αυξημένη αρτηριακή πίεση: συστολική αρτηριακή πίεση  $\geq 130$  mmHg διαστολική  $\geq 85$  mmHg ή λήψη αντιυπερτασικών φαρμάκων
- Αυξημένα επίπεδα γλυκόζης νηστείας:  $\geq 100$  mg/dL ή λήψη αντιδιαβητικών φαρμάκων

(Σημείωση: η Αμερικάνικη Εταιρεία Κλινικής Ενδοκρινολογίας, η Διεθνής Ομοσπονδία Διαβήτη και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας υιοθετούν άλλους παρόμοιους ορισμούς για το Μεταβολικό Σύνδρομο).

Παρά το γεγονός ότι η υψηλή κατανάλωση υδατανθράκων και ζάχαρης συνδέεται με υψηλότερα ποσοστά κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου σε ενήλικες, δεν γνωρίζαμε πολλά σχετικά με την επίδραση των πρόσθετων σακχάρων στους εφήβους [140]. Η μελέτη NHANES (National Health And Nutrition Examination Survey) 1999-2004, έδειξε ότι η κατανάλωση πρόσθετων σακχάρων συνδέεται θετικά με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων στους εφήβους. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι ο κίνδυνος

καρδιαγγειακής νόσου μπορεί να μειωθεί από την ελαχιστοποίηση της πρόσληψης ζάχαρης.

Μια μετα-ανάλυση πολλών πληθυσμιακών μελετών έδειξε ότι η κατανάλωση σοκολάτας σχετίζεται με σημαντική μείωση του κινδύνου (περίπου 30%) σε καρδιομεταβολικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων της στεφανιαίας νόσου, των καρδιακών θανάτων, του διαβήτη και των εγκεφαλικών επεισοδίων [141]. Τα προφανή οφέλη της σοκολάτας μπορούν να προκύψουν από μια ευεργετική επίδραση των πολυφαινόλων που βρίσκονται στο κακάο και αυξάνουν την βιοδιαθεσιμότητα του νιτρικού οξειδίου. Αυτά τα ευρήματα βασίζονται σε μελέτες παρατήρησης και περαιτέρω πειραματικές μελέτες απαιτούνται για την επιβεβαίωση της πιθανή ευεργετικής επίδρασης της κατανάλωσης σοκολάτας.

**Ψυχικό στρες και κατάθλιψη:** Η κατάθλιψη σχετίζεται στενά με την εμφάνιση ΣΝ [142]. Η αδρενεργική διέγερση κατά τη διάρκεια του στρες μπορεί να αυξήσει τις απαιτήσεις του μυοκαρδίου σε οξυγόνο, μπορεί να προκαλέσει αγγειοσύσπαση και έχει συνδεθεί με δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [143] και μεταβολικό σύνδρομο [144]. Σε ενήλικες κάτω των 40 ετών, ιστορικό κατάθλιψης και απόπειρας αυτοκτονίας είναι σημαντικοί ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες πρόωρης καρδιαγγειακής νόσου και θνησιμότητας λόγω ισχαιμικής καρδιακής νόσου σε άνδρες και γυναίκες [145].

## **β. Νεότεροι παράγοντες κινδύνου**

**C - αντιδρώσα πρωτεΐνη:** Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) αυξάνει στο αίμα παρουσία φλεγμονής, σαν αντίδραση του οργανισμού σε τραυματισμό ή λοίμωξη. Η διαδικασία της φλεγμονής φαίνεται να συμβάλει στη δημιουργία, την εξέλιξη και τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και συμμετέχει ενεργά σε όλες τις φάσεις της αθηροθρόμβωσης. Σύμφωνα με ορισμένα ερευνητικά αποτελέσματα, υψηλά επίπεδα CRP στο αίμα μπορεί να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου και οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [146, 147]. Στη μελέτη Jupiter, σε υγιή άτομα χωρίς υπερλιπιδαιμία

αλλά με αυξημένα επίπεδα υψηλής ευαισθησίας - CRP, η ροσουβαστατίνη μείωσε σημαντικά τη συχνότητα σοβαρών καρδιαγγειακών επεισοδίων [148].

**Λιποπρωτεΐνη (a):** Αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης (a) [Lp(a)] είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου πρόωρης ΣΝ [144] και ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας κινδύνου για πρόωρη αθηροθρόμβωση και καρδιαγγειακά επεισόδια. Η μέτρηση της Lp(a) είναι πιο χρήσιμη σε νεαρά άτομα με ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό πρόωρης αγγειακής νόσου και επαναλαμβανόμενες παρεμβάσεις στις στεφανιαίες αρτηρίες.

Σε ασθενείς με γενετικά επιβεβαιωμένη ετερόζυγο οικογενή υπερχοληστερολαιμία, η παρουσία αυξημένων επιπέδων Lp(a) είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης ΣΝ πέρα από αυξημένα επίπεδα LDL-χοληστερόλης [149].

**Η ομοκυστεΐνη:** αποτελεί μεταβολικό προϊόν διάσπασης της μεθειονίνης. Στο γενικό πληθυσμό, ήπιες έως μέτριες αυξήσεις της οφείλονται σε ανεπαρκή διαιτητική πρόσληψη φυλλικού οξέος. Τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο καρδιακής νόσου [150] μέσω της τεκμηριωμένης αντίστροφης συσχέτισης με τη συγκέντρωση της HDL χοληστερόλης, αλλά και της αναστολής της σύνθεσης apoA-I [151, 152] αν και η χορήγηση φυλλικού δεν μεταβάλλει ουσιαστικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακής νόσου [153 - 155].

**Ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου:** Ανισορροπία μεταξύ της δραστηριότητας των ινωδολυτικών ενζύμων (π.χ., ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου [tPA]) και των αντίστοιχων αναστολέων τους (αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου [PAI-1]) μπορεί να προδιαθέτει σε έμφραγμα του μυοκαρδίου [156 - 158].

**Μικρά, πυκνά μόρια LDL:** Άτομα με αυξημένη συγκέντρωση μικρών, πυκνών μορίων LDL βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ΣΝ. Έτσι, η σύνθεση του πυρήνα, το μέγεθος και η συγκέντρωση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων μπορεί να παράσχει ένα καλύτερο μέτρο πρόβλεψης καρδιαγγειακού κινδύνου [159]. Ο κίνδυνος στεφανιαίας νόσου που προκύπτει από την LDL χοληστερόλη οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα μόρια της LDL που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη C-III [160].

**Το ινωδογόνο:** Τα επίπεδα του ινωδογόνου, αυξάνουν κατά τη διάρκεια μια φλεγμονώδης αντίδρασης. Αυτή η διαλυτή πρωτεΐνη εμπλέκεται στη συνάθροιση των αιμοπεταλίων και στο ιξώδες του αίματος και μεσολαβεί στο σχηματισμό θρόμβου. Σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ επιπέδων ινωδογόνου και κινδύνου καρδιαγγειακών συμβαμάτων βρέθηκαν στις μελέτες του Γκέτεμποργκ, του Northwick Park και Framingham [161].

**Άλλοι παράγοντες:** Παθήσεις όπως η τελικού σταδίου χρόνια νεφρική νόσος [162], χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες του συνδετικού ιστού (π.χ. συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα) [163, 164], ο ιός της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (HIV) λοίμωξη (σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας [AIDS], υψηλής δραστηριότητας αντιρετροϊκή θεραπεία [HAART]) [165] και άλλες καταστάσεις φλεγμονής έχουν όλα αναφερθεί ότι συμβάλουν στην ανάπτυξη ΣΝ.

Η τελικού σταδίου χρόνια νεφρική νόσος συσχετίζεται με αναιμία, υπερομοκυστεϊναιμία, αυξημένο γινόμενο φωσφόρου - ασβεστίου, εναποθέσεις ασβεστίου, υπολευκωματιναιμία, αυξημένη τροπονίνη, αυξημένους δείκτες φλεγμονής, αυξημένο οξειδωτικό στρες και μειωμένη δραστηριότητα μονοξειδίου του αζώτου, τα οποία συμβάλουν στον αυξημένο κίνδυνο για ΣΝ [162].

Χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης ορού έχουν σημαντική αρνητική επίδραση σε ασθενείς με διαγνωσμένη ΣΝ [166]. Μια μετα-ανάλυση δείχνει ότι η στυτική δυσλειτουργία αυξάνει τον κίνδυνο της καρδιαγγειακής νόσου, στεφανιαίας νόσου, εγκεφαλικού επεισοδίου και συνολικής θνησιμότητας. Αυτός ο επιπλέον κίνδυνος μπορεί να είναι ανεξάρτητος από τους συμβατικούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου [167].

Γυναίκες ηλικίας 50 ετών ή νεότερες, οι οποίες υποβάλλονται σε υστερεκτομή έχουν αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο [168]. Η ωοθηκεκτομή αυξάνει επίσης τον κίνδυνο τόσο για στεφανιαία νόσο όσο και για εγκεφαλικό επεισόδιο.

Πολύ μικρή διάρκεια ύπνου ( $\leq$  5-6 ώρες ανά νύχτα) ή πολύ μεγάλη ύπνου ( $>$  8-9 ώρες ανά νύχτα) αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Πολύ μικρή διάρκεια ύπνου συνδέεται επίσης με αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου. Η συσχέτιση μεταξύ ύπνου και καρδιακών επεισοδίων

είναι σταθερή σε διαφορετικούς πληθυσμούς [169]. Η αϋπνία σχετίζεται με ένα μέτρια αυξημένο κίνδυνο οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου [170].

Ανεπάρκεια βιταμίνης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και γενικά υπάρχει γραμμική συσχέτιση σε επίπεδα βιταμίνης D (25-OHD) από 20 έως 60 nmol/L [171]. Κάθε 10 ng/ml χαμηλότερη 25-OHD συγκέντρωση συνδέθηκε με 9% μεγαλύτερο σχετικό κίνδυνο θανάτου και 25% μεγαλύτερο σχετικό κίνδυνο εμφράγματος μυοκαρδίου. Συγκεντρώσεις βιταμίνης D < 15 ng/ml συσχετίστηκαν με 29% μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου [172].

**Γενετικοί δείκτες:** Η ΣΝ είναι μια περίπλοκη, πολυπαραγοντική ασθένεια και η ανάπτυξη και η εξέλιξη της καθορίζονται από την αλληλεπίδραση γενετικής, περιβάλλοντος και διατροφής. Επιπλέον, η μετάβαση από σταθερή αθηρωματική νόσο σε ένα μείζον καρδιαγγειακό επεισόδιο (π.χ. ασταθής στηθάγχη, έμφραγμα του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικό επεισόδιο) είναι ελάχιστα κατανοητή. Τα βιολογικά μονοπάτια και γονίδια που διέπουν την προδιάθεση για καρδιαγγειακά συμβάματα μόλις αρχίζουν να περιγράφονται. Γονιδιακές μελέτες αρχίζουν να ξετυλίγουν τη γενετική αρχιτεκτονική τέτοιων γεγονότων [173], αλλά τα ευρήματα τους περιορίζονται σημαντικά λόγω των περιβαλλοντικών παραγόντων. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να μας διαφωτίσει σχετικά με τη μοριακή βάση των παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακά επεισόδια. Όσο προχωρά η αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, ο κατάλογος των γενετικών παραγόντων που ενέχονται στη ΣΝ αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω, χωρίς ωστόσο μέχρι σήμερα να έχει κλινική εφαρμογή ο έλεγχος του γονότυπου για την εκτίμηση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου σε ασυμπτωματικούς ενήλικους.

**Βιοδείκτες:** Σε μια 10-ετή σύγκριση 10 βιοδεικτών για την πρόβλεψη του θανάτου και μειζόνων καρδιαγγειακών επεισοδίων σε περίπου 3000 άτομα, την υψηλότερη προγνωστική αξία για την πρόβλεψη του θανάτου είχαν τα επίπεδα στο αίμα του Β-τύπου νατριουρητικού πεπτιδίου (BNP), της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), της ομοκυστεΐνης, της ρενίνης και ο λόγος λευκωματίνης/κρεατινίνη ούρων [174]. Την υψηλότερη προγνωστική αξία για

την πρόβλεψη μειζόνων καρδιαγγειακών επεισοδίων είχαν η συγκέντρωση BNP και ο λόγος λευκωματίνης/κρεατινίνης ούρων.

Η Κυστατίνη C (Cys-C) έχει προταθεί ως δείκτης της νεφρικής δυσλειτουργίας που σχετίζεται με καρδιαγγειακά επεισόδια και έχει αποδειχθεί ότι είναι προγνωστική της μακροχρόνιας θνησιμότητας σε ασθενείς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία [175].

Τα άτομα με αυξημένες τιμές πολλαπλών βιοδεικτών είχαν 4 φορές υψηλότερο κίνδυνο θανάτου και σχεδόν 2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο σοβαρών καρδιαγγειακών επεισοδίων σε σχέση με εκείνους με χαμηλότερες τιμές. Εντούτοις, η χρήση πολλαπλών βιοδεικτών προσθέτει μόνο μέτρια στη συνολική πρόβλεψη κινδύνου με βάση τους συμβατικούς καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου [174].

Η μέτρηση της HDL χοληστερόλης θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως μέρος της αρχικής εκτίμησης καρδιαγγειακού κινδύνου, αλλά δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως εργαλείο πρόβλεψης του υπολειπόμενου καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς που αντιμετωπίζονται με υψηλή δόση μιας ισχυρής στατίνης για τη μείωση της LDL χοληστερόλης [176].

## **1.2 Ο ρόλος της φλεγμονής στις καρδιαγγειακές παθήσεις.**

Η μυοκαρδιακή φλεγμονή έχει γίνει ευρέως αποδεκτό ότι διαδραματίζει καίριο ρόλο στους φυσιολογικούς και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της καρδιακής λειτουργίας και δυσλειτουργίας αντίστοιχα. Αποτελεσματική φλεγμονώδης αντίδραση απαιτείται για την άμυνα του ξενιστή εναντίον των παθογόνων παραγόντων και για την αποκατάσταση της ιστικής βλάβης. Ωστόσο, υπερβολική ή χρόνια μυοκαρδιακή φλεγμονή, φαίνεται ότι προκαλεί σοβαρή βλάβη στον ξενιστή και εμπλέκεται σε μια σειρά από καρδιακές διαταραχές, όπως μυοκαρδίτιδα [177], έμφραγμα μυοκαρδίου [178], βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης [179], καρδιακή ανεπάρκεια [180], στένωση αορτικής βαλβίδας [181], αθηροσκλήρωση [182] και υπέρταση [183]. Κατά τη διαδικασία της μυοκαρδιακής φλεγμονής, τα μυοκαρδιακά κύτταρα εκφράζουν μόρια που συμβάλλουν στη διήθηση του μυοκαρδίου από ουδετερόφιλα,

συμπεριλαμβανομένων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, μορίων κυτταρικής επιφάνειας και χυμοκινών. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί της μυοκαρδιακής φλεγμονής είναι πολύπλευροι. Η φλεγμονώδης αντίδραση ξεκινά από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors - PRRs), που αποτελούν βασικά συστατικά της έμφυτης/εγγενούς ανοσίας [184]. Οι PRR αναγνωρίζουν και ανταποκρίνονται σε μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με βλάβη (Damage-associated molecular patterns - DAMPs), συμπεριλαμβανομένων των εξωγενών μοριακών προτύπων που σχετίζονται με παθογόνα (Pathogen-associated Molecular Patterns - PAMPs) που είναι διατηρημένες δομές των παθογόνων μικροοργανισμών και των ενδογενών αλαρμινών που απελευθερώνονται ως απάντηση στο στρες ή την ιστική βλάβη [185].

Μεταξύ των PRRs, οι ανάλογοι των Toll υποδοχείς (TLRs) παρουσιάστηκαν πρώτοι και έχουν μελετηθεί πιο εκτενώς. Η σύνδεση των DAMPs στους TLRs ενεργοποιεί τη φλεγμονώδη απόκριση των μυοκαρδιακών κύτταρων, η οποία αντιπροσωπεύει την πρώτη γραμμή άμυνας της έμφυτης/εγγενούς ανοσίας και διαμορφώνει την προσαρμοστική ανοσοποιητική απόκριση [186]. Ο TLR4, ένα βασικό μέλος της οικογένειας των TLRs, έχει ευρύ φάσμα λειτουργιών σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων [78], των αλλεργικών παθήσεων [187], των μεταβολικών νοσημάτων που σχετίζονται με την παχυσαρκία [188], των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων [189], της απόπτωσης [190], των αυτοάνοσων διαταραχών [191], των λοιμωδών νοσημάτων [192], και των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου [193]. Κυρίως όμως, ο TLR4, του οποίου τα επίπεδα είναι τα υψηλότερα σε σύγκριση με τους υπόλοιπους TLR στην καρδιά, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη μυοκαρδιακή φλεγμονή, συμπεριλαμβανομένης της μυοκαρδίτιδας [194], του εμφράγματος του μυοκαρδίου [195], της βλάβης από ισχαιμία / επαναιμάτωση [196], της καρδιακής ανεπάρκειας [180], της στένωσης της αορτικής βαλβίδας [197], της αθηροσκλήρωσης [198] και της υπέρτασης [199].



**1.2.1 Οι οικογένεια των ανάλογων των Toll υποδοχέων (Toll-like Receptors–TLRs):** Οι TLRs είναι μια οικογένεια PPRs που αρχικά αναγνωρίστηκαν το 1984 για το ρόλο τους στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης της μύγας των φρούτων *Drosophila melanogaster* [200]. Οι TLR εκφράζονται σε διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μυοκαρδιακών κυττάρων, των λείων μυϊκών κύτταρων, και των ενδοθηλιακών κυττάρων [201]. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του αγγελιοφόρου RNAs (mRNAs) για τους TLR στην ανθρώπινη καρδιά κατατάσσονται ως εξής TLR4 >TLR2 >TLR3 >TLR5 >TLR1 >TLR6 >TLR7 >TLR8 >TLR9 >TLR10. Ειδικότερα, η σχετική έκφραση mRNA των TLR2, TLR3 ή TLR4 είναι ~ 10 φορές υψηλότερη από ότι των TLR1 ή TLR5 – 10 [202]. Επιπλέον, έκφραση των TLR έχει επίσης παρατηρηθεί σε εγκέφαλο, νεφρούς, ήπαρ, πνεύμονες, έντερο, νωτιαίο μυελό, σπλήνα, και αναπαραγωγικά όργανα [203].

Η σύνθεση των TLR πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια με τη συσκευή Golgi είτε οδηγούνται στην κυτταρική μεμβράνη (εξωκυττάριοι TLR1, 2, 4, 5, 6) είτε παραμένουν στα ενδοσωμάτια ή λυσοσωμάτια (ενδοκυττάριοι TLR3, 7, 8, 9). Αν και εξωκυττάριοι και ενδοκυττάριοι TLR έχουν παρόμοια τελική στερεοδιαμόρφωση (δίκηνη πετάλου), παρέχουν μια πλατφόρμα για την αναγνώριση ενός διαφορετικού συνόλου συνδετών αντίστοιχα. Ένας μηχανισμός διάκρισης των συνδετών εξαρτάται από τα διαφορετικά κατάλοιπα των εξωκυττάριων περιοχών (ectodomain) του κάθε TLR. Τα πλούσια σε λευκίνη μοτίβα που βρίσκονται στην εξωκυττάρια περιοχή των TLR αποτελούνται από 20 – 30 αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένης της ακολουθίας LxxLxLxxN. Παραλλαγές των αμινοξέων μέσα σε αυτά τα μοτίβα οδηγούν σε διαφορές στη δομική διαμόρφωση που επιτρέπει την αλληλεπίδραση με διαφορετικούς συνδέτες [204]. Ένας άλλος μηχανισμός στηρίζεται στο σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών. Οι περισσότεροι TLR σχηματίζουν ομοδιμερή, με λίγες εξαιρέσεις. Για παράδειγμα, ο TLR2 σχηματίζει ετεροδιμερή με τον TLR1 ή τον TLR6, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα διαφορετικής αναγνώρισης λιποπεπτιδίων: ο TLR1–TLR2 αναγνωρίζει τριακυλιωμένα λιποπεπτίδια, ενώ ο TLR2-TLR6 αναγνωρίζει διακυλιωμένα λιποπεπτίδια [205, 206]. Εκτός αυτού, οι συμπάραγοντες μπορεί επίσης να αντανakλούν την ποικιλομορφία της σύνθεσης των συνδετών των TLR,

δεδομένου ότι εξασφαλίζουν σωστή ανίχνευση των DAMPs και τη διάκριση μεταξύ των ίδιων και ξένων μορίων. Τα TLR4 ομοδιμερή μπορούν να συνδεθούν με συμπαραγόντες, όπως ο CD14, MD2 (Myeloid Differentiation factor 2) και lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP), που μπορούν να συνδεθούν περαιτέρω με συγκεκριμένα μόρια, αποφεύγοντας άλλους συνδέτες. Για να εξασφαλιστεί ότι οι συνδέτες των TLR4 μπορούν να φθάσουν σε συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές δομές και να εκκινήσουν σηματοδότηση, οι συμπαραγόντες παίζουν επίσης ρόλο στην ορθή αναδίπλωση του TLR4 στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), την τοποθέτηση στο κατάλληλο υποκυτταρικό διαμέρισμα και τον πρωτεϊνικό μετασχηματισμό [207].

Ο κίνδυνος υπερβολικής φλεγμονής είναι ιδιαίτερα χαμηλός, τα πρώτα χρόνια της ζωής, αλλά αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας. Υπάρχουν στοιχεία ότι η λειτουργία ανίχνευσης των TLR είναι επαρκώς ανεπτυγμένη στα νεογνά. Η έκφραση των TLR στα μονοκύτταρα φαίνεται να είναι σταθερή σε επίπεδα ενηλίκων κατά τα πρώτα 5 χρόνια της ζωής. Με άλλα λόγια, η διαφορική έκφραση των TLR φαίνεται απίθανο να είναι η κύρια αιτία για την τροποποιημένη ευαισθησία στην φλεγμονή στην πολύ νεαρή ηλικία έναντι της ενήλικης. Παρόλο που η TLR έκφραση και σηματοδότηση στην πρώιμη ζωή εμφανίζονται παρόμοιες με των ενηλίκων, η TLR-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση της έμφυτης/εγγενούς ανοσίας είναι σημαντικά μειωμένη στην πρώιμη ζωή. Ουσιαστικά, ο TLR4 έχει ως επί το πλείστο αντιφλεγμονώδη επίδραση στην καρδιά των νεογνών μέσω υψηλής παραγωγής IL-10, ενώ όλες οι άλλες απαντήσεις της έμφυτης/εγγενούς ανοσίας καταστέλλονται. Στα ηλικιωμένα άτομα, οι TLR4 γενικά εκφράζονται στα μονοκύτταρα σε χαμηλότερα επίπεδα. Επιπλέον, οι ηλικιωμένοι μπορεί να εμφανίζουν μείωση σχεδόν σε όλες τις TLR-μεσολαβούμενες απαντήσεις της έμφυτης ανοσίας και υψηλότερα βασικά επίπεδα πολλών προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών [208].

**1.2.2 Ο TLR4:** Ο ανθρώπινος TLR4 ήταν ο πρώτος ανάλογος των Toll υποδοχέας που αναγνωρίστηκε στα θηλαστικά [107 209]. Συντίθεται και εκκρίνεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Μαζί με συνοδά μόρια, συνυποδοχείς και πρωτεΐνες προσαρμογείς, ο TLR4 διακινείται στο cis-Golgi

και εκκρίνεται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου αλληλεπιδρά με τους συνδέτες του και ενεργοποιεί μία σειρά φλεγμονωδών αντιδράσεων [190]. Ο TLR4 σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη MD2 στην κυτταρική επιφάνεια και μαζί αλληλεπιδρούν με το βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Επιπλέον, στη διαδικασία σύνδεσης του LPS συμμετέχουν η συνδεόμενη με τον LPS πρωτεΐνη (LPS-binding protein, LBP) και η CD14. Συγκεκριμένα, η LBP – μια διαλυτή πλάσματική πρωτεΐνη - συνδέεται με τον LPS, ενώ η CD14 συνδέεται με το διμερές LPS-LBP και το μεταφέρει στο σύμπλοκο TLR4-MD2 [207, 210, 211]. Επιπλέον, ο TLR4 συμμετέχει επίσης στην αναγνώριση εξωγενών συνδετών τύπου PAMPs, όπως η πρωτεΐνη σύντηξης του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού και τις γλυκεροφωσφατιδυλινοσιτολικές γέφυρες προσκόλλησης παρασίτων.

Επίσης, ενδογενείς συνδέτες, οι αλαρμίνες, όπως η HPS (Heat shock protein), η HMGB1 (high mobility group box 1), η περιοχή A των φιμπρονεκτινών, ολιγοσακχαρίτες του υαλουρονικού οξέος, η θειική ηπαράνη και το ινωδογόνο, που απελευθερώνονται σε ιστικό τραυματισμό και ενεργοποιούν περαιτέρω τον TLR4 πυροδοτώντας με αυτόν τον τρόπο το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (πίνακας 2) [212, 213]. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι ο καθαριστής υποδοχέας κατηγορίας A (SR-A) των μακροφάγων είναι ένας συν-υποδοχέας για τον TLR4 που διευκολύνει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καταστέλλει την κυτταρική επιβίωση και προωθεί την απόπτωση [214]. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να προσδιοριστεί πώς ο TLR4 αλληλεπιδρά με υποδοχείς καθαριστές (scavenger receptors) κατά τη μυοκαρδιακή φλεγμονή.

	Εξωγενείς συνδέτες	Ενδογενείς συνδέτες	Σηματοδοτικά μονοπάτια
<b>TLR4</b>	LPS, RSV protein F, MMTV envelope protein, VSV glycoprotein G, mannan, glucuronoxylomannan, glycosyl inositol phospholipids, and paclitaxel	Biglycan, CD 138, crystallin A chain, $\beta$ -defensin 2, fibrinogen, fibronectin, heparan sulfate, HMGB1, HSP22–60–70–72, hyaluronan, monosodium urate crystals, oxPAPC, resistin, surfactant protein A, tenascin-C, $\beta$ -amyloid, gp 96, OxLDL, AGE-LDL, angiotensin II, calprotectin, ceramide, mmLDL, MRP-8/14, PAUF, serum amyloid A, and SFA	MAL-MyD88-NF- $\kappa$ B/AP-1 pathway; TRAM-TRIF-NF- $\kappa$ B/IRF3/IRF7 pathway

**Πίνακας 2.** Εξωγενείς και ενδογενείς συνδέτες του TLR4 και τα αντίστοιχα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται.

Συνεχώς αυξανόμενα δεδομένα δείχνουν ότι η ικανότητα ορισμένων ατόμων να ανταποκριθούν κατάλληλα στους συνδέτες του TLR4 μπορεί να επηρεάζεται από πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms - SNPs) στο γονίδιο του TLR4, με αποτέλεσμα μια τροποποιημένη ευαισθησία σε λοιμώδεις και φλεγμονώδεις ασθένειες. Οι δύο πιο συχνοί πολυμορφισμοί (SNPs) για τον TLR4, που έχουν μελετηθεί διεξοδικά είναι οι: Asp299Gly και Thr399Ile [215]. Έχει βρεθεί ότι ο πολυμορφισμός Asp299Gly του ανθρώπινου υποδοχέα TLR4 έχει μια προστατευτική επίδραση έναντι οξέων στεφανιαίων συμβαμάτων και ασθενείς με τον πολυμορφισμό Asp299Gly διατρέχουν μικρότερο κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου [216, 217]. Ο υποκείμενος μηχανισμός μπορεί να περιλαμβάνει αλλαγή στη σύνθεση και τη δομή του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα, που οδηγεί σε μείωση της αλληλεπίδρασης του με τα DAMPs και με αυτόν τον τρόπο εξασθένηση της επακόλουθης μυοκαρδιακής φλεγμονής. Ωστόσο, κλινικές μελέτες που έχουν προσπαθήσει να συνδέσουν τον κίνδυνο της μυοκαρδιακής φλεγμονής με τους πολυμορφισμούς του TLR4 έχουν καταλήξει

σε αντιφατικά αποτελέσματα [218, 219]. Αυτό μπορεί να αποδοθεί πιθανώς στην απλουστευτική θεώρηση για την επίδραση των απλοτύπων, αφού είναι δυνατό να κληρονομηθούν δύο ή περισσότεροι πολυμορφισμοί με διαφορετικές επιδράσεις [220]. Όλες οι σχετικές μελέτες εξακολουθούν να βρίσκονται αντιμέτωπες με προκλήσεις λόγω σημαντικής διακύμανσης στις συχνότητες των αλληλόμορφων, που οφείλονται σε φυλετικές και άλλες διαφορές των πληθυσμών που χρησιμοποιούνται ως ομάδες ελέγχου, καθιστώντας την αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων δύσκολη [202]. Ως εκ τούτου, οι πιθανοί ρόλοι των γονότυπων του TLR4 στη μυοκαρδιακή φλεγμονή απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

#### **α. Τα TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια**

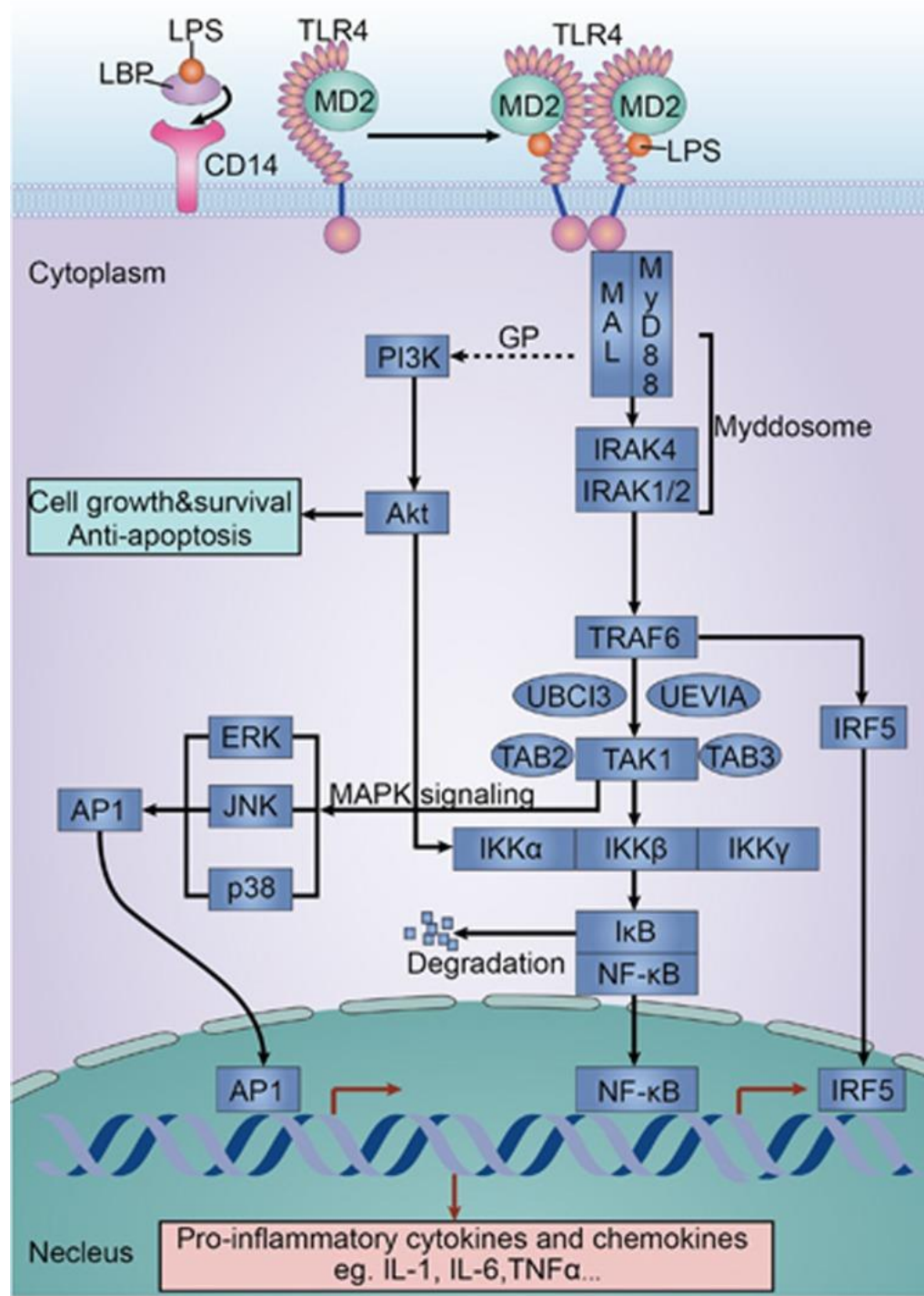
Η ενεργοποίηση του TLR4 από τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) προκαλεί την ενεργοποίηση δύο σηματοδοτικών μονοπατιών: το εξαρτώμενο και το ανεξάρτητο από τον μυελοειδή παράγοντα διαφοροποίησης 88 (MyD88-dependent και MyD88-independent pathways). Αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο πυρηνικός παράγοντας-κΒ (NF-κΒ) και ρυθμιστικούς παράγοντες ιντερφερόνης (IFRs), που στη συνέχεια επάγουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και ιντερφερονών (IFNs), αντίστοιχα, όπως θα δούμε αναλυτικά στη συνέχεια.

**i) Το MyD88-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι** (The MyD88-dependent signaling pathway): Ενεργοποιείται μέσω της MyD88 (Myeloid Differentiation primary response 88) μετά την ενεργοποίηση του TLR4. Η MyD88, μια πρωτεΐνη προσαρμογέας, ζωτικής σημασίας για τα TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια, μέσω της καρβοξυτελικής (κυτταροπλασματικής) περιοχής TIR (Toll/interleukin-1receptor) και της αμινοτελικής περιοχής θανάτου συνδέεται με την TIR περιοχή του TLR4. Στη συνέχεια, η περιοχή θανάτου του MyD88 συνδέεται με την κινάση IRAK4 (IL-1 receptor-associated kinase 4), που ενεργοποιεί ένα από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας IRAK, την IRAK1 ή IRAK2 [221, 222]. Το σύμπλεγμα της οικογένειας MyD88-IRAKs έχει χαρακτηριστεί ως «Myddosome» και είναι απαραίτητο για την φλεγμονή και

την κινητοποίηση της έμφυτης/εγγενούς ανοσίας [223]. Η IRAK στη συνέχεια απομακρύνεται από το Myddosome και αλληλεπιδρά με τον TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6). Ο TRAF6 σχηματίζει σύμπλεγμα με την κινάση TAK1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1), την πρωτεΐνη TAB1 (TAK1-binding protein 1) και την TAB2. Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2 συνδέεται με τις λιγκάσες ουμπικουϊίνης, συμπεριλαμβανομένων των Ubc13 (ubiquitin-conjugating enzyme 13) και Uev1A (ubiquitin-conjugating enzyme1A). Η TAK1, στη συνέχεια, ενεργοποιεί το σύμπλεγμα των ανασταλτικών  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) κινασών  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$  (IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /IKK $\gamma$ , επίσης γνωστών ως IKK1, IKK2 και NEMO, αντίστοιχα) και επάγει την I $\kappa$ B φωσφορυλίωση. Ο φωσφορυλιωμένος I $\kappa$ B (αναστολέας του NF- $\kappa$ B) απομακρύνεται από το σύμπλεγμα και μετά από ουμπικουϊίνωση αποδομείται, ενεργοποιώντας έτσι τον μεταγραφικό παράγοντα NF- $\kappa$ B. Ο ενεργοποιημένος NF- $\kappa$ B μεταφέρεται στον πυρήνα και μεσολαβεί στην έκφραση μιας σειράς γονιδίων προφλεγμονωδών κυτταροκινών [224, 225]. Εκτός από την ενεργοποίηση του συμπλέγματος IKK, η TAK1 ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κινασών MAPK (mitogen-activated protein kinase), όπως το μονοπάτι JNK (c-JunN-terminal kinase) και p38 [124], που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1. Η ενεργοποίηση των NF- $\kappa$ B και AP-1 οδηγεί στην έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-6, η IL-1, και ο TNF- $\alpha$  (Εικόνα 6) [227].

Εκτός από τους μεταγραφικούς παράγοντες NF- $\kappa$ B και AP-1, πληθώρα άλλων IRF (interferon regulatory factor) μεταγραφικών παραγόντων ενεργοποιούνται μέσω της MyD88-εξαρτώμενης σηματοδότησης και συμμετέχουν σε διαφορετικά TLR-επαγόμενα προφίλ γονιδιακής έκφρασης. Οι παράγοντες IRF5 και IRF7 αλληλεπιδρούν με τον MyD88 και ρυθμίζουν την TLR-εξαρτώμενη επαγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και ιντερφερονών τύπου I [228 - 230]. Ο IRF4 αλληλεπιδρά με τον MyD88 και λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της MyD88/IRF5 διαμεσολαβούμενης γονιδιακής έκφρασης [231]. Ο IRF1 ο οποίος επάγεται από την IFN- $\alpha$  ενεργοποιείται από την MyD88 και στη συνέχεια μεταναστεύει στον πυρήνα και διαμεσολαβεί την επαγωγή IFN- $\beta$ , NO συνθετάσης και IL-12 P38 [232]. Τέλος η IRF8

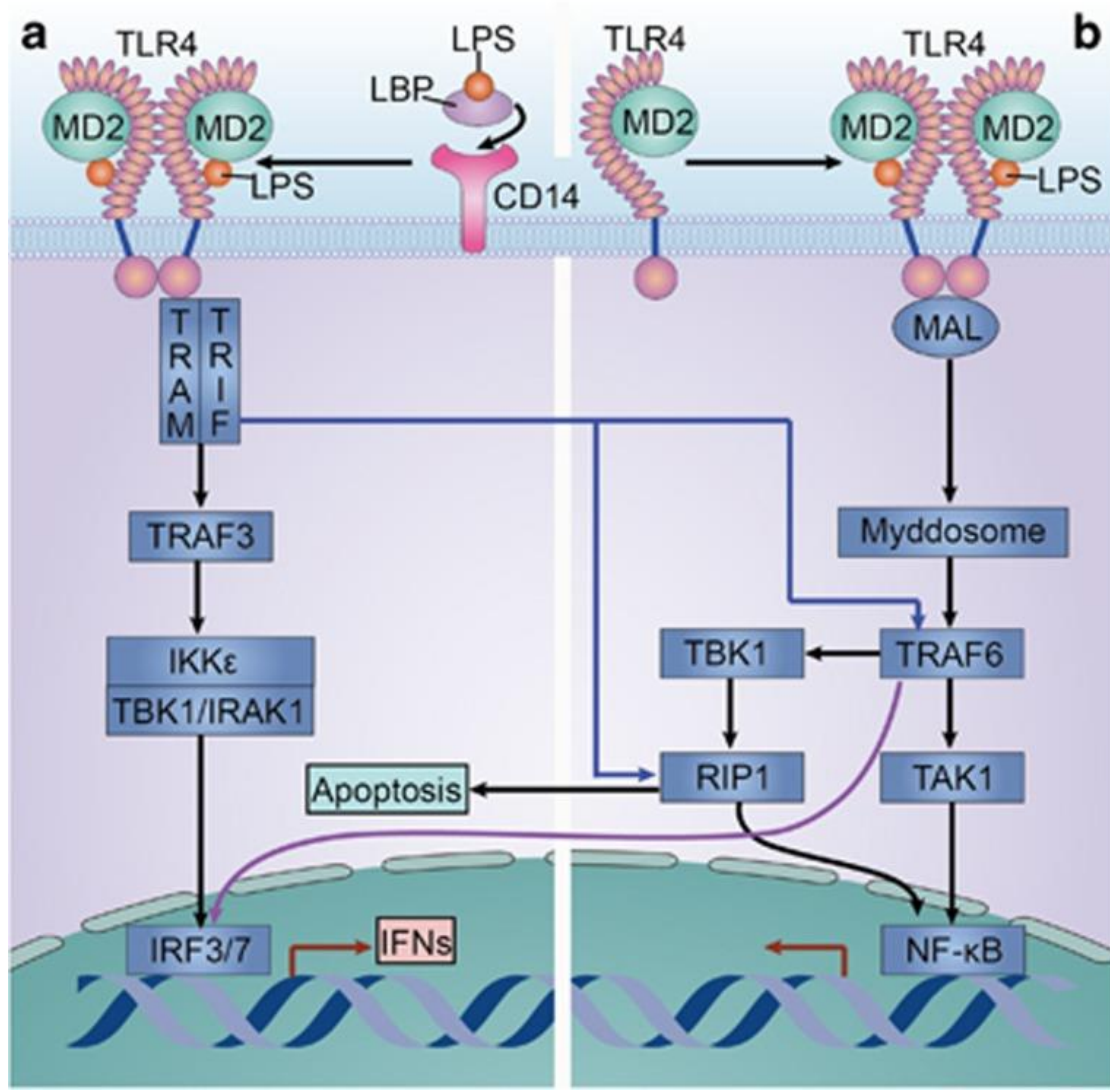
αλληλεπιδρά με τον TRAF6 και ρυθμίζει την παραγωγή διαμεσολαβητών φλεγμονής [233].



**Εικόνα 6.** Το MyD88-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι (The MyD88-dependent signaling pathway).

ii) **To MyD88-ανεξάρτητο σηματοδοτικό μονοπάτι** (The MyD88-independent pathway): Ένας παράλληλος, ανεξάρτητος του MyD88 μηχανισμός της TLR4 σηματοδότησης οδηγεί στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών. Η ενεργοποίηση του TLR4 οδηγεί σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 (Interferon Regulatory Factor-3) και σε ενεργοποίηση του NF-κB [234]. Η ενεργοποίηση του IRF3 οδηγεί σε παραγωγή ιντερφερόνης-β, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) και επάγει ποικιλία γονιδίων επαγόμενων από ιντερφερόνη [235]. Το MyD88-ανεξάρτητο μονοπάτι ξεκινά με τις πρωτεΐνες προσαρμογείς TRAM (TRIF-related adapter molecule) και TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β). Η πρόσδεση του PAMP στον TLR4, προκαλεί μέσω της TRAM ενεργοποίηση της TRIF, η οποία συνδέεται με τον TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3). Από το σημείο αυτό είναι δυνατό να ξεκινήσουν τρία επιμέρους σηματοδοτικά μονοπάτια. Στην πρώτη περίπτωση, ο TRAF3 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /TBK1, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης τον παράγοντα IRF3. Ο IRF3 διμερίζεται και μεταφέρεται μέσα στον πυρήνα επάγοντας την παραγωγή ιντερφερόνης τύπου I. Στη δεύτερη περίπτωση η TRIF αλληλεπιδρά με την RIP1 δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα που δρα με παρόμοιο τρόπο σε συνδυασμό με το σύμπλεγμα IKK και επιφέρει ενεργοποίηση του NF-κB (Εικόνα 7a). Τέλος στην τρίτη περίπτωση η TRIF μπορεί να ενεργοποιήσει την TRAF6 εκκινώντας ένα σηματοδοτικό μονοπάτι παρόμοιο με το MyD88-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι (Εικόνα 7b) [236].





**Εικόνα 7.** α) Το MyD88-ανεξάρτητο σηματοδοτικό μονοπάτι (The MyD88-independent pathway) και β) η αλληλεπίδραση με το MyD-εξαρτώμενο μονοπάτι.

### 1.2.3 Ο ρόλος του TLR4 στη Μυοκαρδιακή Φλεγμονή

**α. Μυοκαρδίτιδα:** Πρόσφατα στοιχεία ανέδειξαν ότι η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και η φλεγμονή διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη Μυοκαρδίτιδα, και ότι ο TLR4 συμμετέχει στην επαγωγή των προφλεγμονωδών και αντιικών κυτταροκινών.

**Ιογενής Μυοκαρδίτιδα:** Η ιογενής λοίμωξη θεωρείται η πιο κοινή αιτία της μυοκαρδίτιδας, με κύριο αίτιο τον ιό Coxsackie B3 (CVB3). Υπάρχουν ισχυρά στοιχεία για τη συμβολή της αναστολής του TLR4 στη βελτίωση της μυοκαρδιακής φλεγμονής στην ιογενή μυοκαρδίτιδα. Σε μοντέλο ποντικού με CVB3 λοίμωξη, τα TLR4-ανεπαρκή ποντίκια είναι πιο ανθεκτικά στην CVB3 λοίμωξη με μειωμένη φλεγμονώδη απόκριση, ιογενή αναπαραγωγή και ηπιότερη μυοκαρδίτιδα σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου [194]. Η CVB3 μόλυνση αυξάνει τα καρδιακά επίπεδα της IL-1β και IL-18 στον άγριο τύπο αλλά όχι στα TLR4-ανεπαρκή ποντίκια. Αντίθετα, τα TRIF-ανεπαρκή ποντίκια εμφανίζουν μια TLR4-εξαρτώμενη καταστολή της αντιικής κυτταροκίνης IFN-β, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια και 100% θνητότητα [237]. Ειδικότερα, η έλλειψη του MyD88 οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως IL-1β και IL-18, αλλά αυξημένη έκφραση των IRF3 και IFN-β και σημαντικά υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης απ' ότι στα ποντίκια άγριου τύπου [238]. Έτσι, ο TLR4 δεν μπορεί μόνο να αυξήσει το σοβαρότητα της ιογενούς μυοκαρδίτιδας μέσω της MyD88-εξαρτώμενης οδού, αλλά μπορεί επίσης να περιορίσει τη σοβαρότητα της μέσω της MyD88-ανεξάρτητης οδού. Ωστόσο, το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι έχει πιο πρωταγωνιστικό ρόλο απ' ότι το MyD88-ανεξάρτητο μονοπάτι στις περισσότερες περιπτώσεις ιογενούς μυοκαρδίτιδας.

**Αυτοάνοση Μυοκαρδίτιδα:** Η αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα είναι μια μεσολαβούμενη από τα βοηθητικά T17 λεμφοκύτταρα (Th-17) αυτοάνοση καρδιακή νόσος και χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη διήθηση που περιλαμβάνει κυρίως λεμφοκύτταρα και μακροφάγα [239]. Παραμένει ανεπαρκώς κατανοητό ποια επίδραση ασκούν τα δραστικά T λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα στην πορεία της αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας. Ειδικότερα, ο ρόλος του TLR4 θεωρείται αμφιλεγόμενος.

Ο TLR4 επάγει τη σύνθεση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στα δενδριτικά κύτταρα, όπως η IL-6, οδηγεί σε διαφοροποίηση των Th-17 και επιδεινώνει τη μυοκαρδιακή φλεγμονή [240]. Επιπλέον, η χορήγηση αδιπνονεκτίνης εξασθενεί τη φλεγμονώδη ενεργοποίηση και την αλληλεπίδραση των καρδιακών και ανοσοποιητικών κυττάρων με ελαχιστοποίηση TLR4 σηματοδοτικών μονοπατιών, ασκώντας με αυτόν τον τρόπο καρδιοπροστατευτική δράση στην αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα [241]. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επί του παρόντος αδιάσειστα στοιχεία ότι η αναστολή του TLR4 μπορεί να οδηγήσει σε ευεργετικές επιδράσεις στα κλινικά τελικά σημεία. Είναι επίσης ενδιαφέρον, ότι σε ένα μοντέλο ποντικού με πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα η χορήγηση του TLR4 αγωνιστή LPS μειώνει σημαντικά τη σοβαρότητα της αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας και μειώνει τον αριθμό των δραστικών T-κυττάρων που αντιδρούν σε αυτοαντιγόνα [239]. Αυτό υποδηλώνει ότι η έμφυτη/εγγενής ανοσία και οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις μπορεί να παρέχουν επίσης ευεργετικές επιδράσεις ενεργοποιώντας καρδιοπροστατευτικά σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω της TLR4 σηματοδότησης.

Ως εκ τούτου, η μυοκαρδιακή φλεγμονή είναι μια γενική διαδικασία. Δεν είναι πάντα σαφές αν είναι ευεργετική ή επιζήμια, δεδομένου ότι υπάρχει ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών αντιδράσεων. Από μια εξελικτική σκοπιά, είναι πιθανό ότι ο θεμελιώδης ρόλος του TLR4 είναι να προστατεύει την καρδιά ενάντια στα DAMPs, αλλά από την άλλη πλευρά, ο TLR4 συνδέεται επίσης με καταστροφικές φλεγμονώδεις διαδικασίες που επιδεινώνουν τη μυοκαρδιακή βλάβη.

**β. Έμφραγμα του Μυοκαρδίου:** Τα νεκρωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα λόγω εμφράγματος απελευθερώνουν πλήθος DAMP, που οδηγούν σε ενεργοποίηση των TLR4 [242], η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, που προκαλούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις και περαιτέρω βλάβη στο ήδη τραυματισμένο μυοκάρδιο. Σημειωτέον, ότι τα TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια σχετίζονται με τη βαρύτητα του εμφράγματος και όχι με την έκταση της φλεγμονής [243].

Η έκφραση TLR4 και των παρακάτω του γονιδίων επάγεται τόσο στην περιοχή του εμφράκτου όσο και στο απομακρυσμένο μυοκάρδιο μετά από έμφραγμα [180]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή των TLR4 σηματοδοτικών μονοπατιών είναι ευεργετική για την άμβλυση της φλεγμονώδους απόκρισης και της περαιτέρω βλάβης του ήδη τραυματισμένου μυοκαρδίου. Για παράδειγμα, η ένεση shRNA από Lentivirus έναντι του TLR4 στην εμφραγματική καρδιά μπορεί να μειώσει σημαντικά το μέγεθος του εμφράκτου και να βελτιώσουν την καρδιακή λειτουργία in vivo [180]. Εκτός αυτού, ο TLR4 αναστολέας μετορμίνη οδηγεί σε ελαττωμένη έκφραση των μεσολαβητών που εμπλέκονται στο έμφραγμα του μυοκαρδίου και την επακόλουθη μυοκαρδιακή βλάβη, συμπεριλαμβανομένων των TNF-α, IL-6 και IL-10 [195].

Πολλές μελέτες διερεύνησαν τα πολλαπλά DAMP που απελευθερώνονται από τα νεκρωτικά μυοκαρδιακά και ενεργοποιούν τους TLR4 μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου. Η πρωτεΐνη S100 A1 (S100 calcium-binding protein A1) έχει αναφερθεί ότι είναι ένας αγωνιστής του TLR4 και επίσης μια ενδογενής αλαρμίνη, η οποία επάγεται σε ποντίκια με έμφραγμα του μυοκαρδίου [244]. Ενδοκαρδιακή ένεση S100 A1 μεγεθύνει την έκταση του εμφράκτου και επιδεινώνει τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας μετεμφραγματικά [244]. Η S100 A8 / A9, επίσης ένας ενδογενής συνδέτης του TLR4, απελευθερώνεται μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου και ενισχύει τη φλεγμονώδη απόκριση [245]. Επιπλέον, η πρωτεΐνη HMGB1, η γκαλεκτίνη-3, η S100β και η IL-1α που απελευθερώνονται από νεκρωτικά μυοκαρδιακά κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή του μυοκαρδίου μέσω των TLR4 σηματοδοτικών μονοπατιών [246]. Έτσι, τα DAMP που απελευθερώνονται και οι TLR4 ίσως να αποτελούν χρήσιμους βιοδείκτες και θεραπευτικό στόχο στη μυοκαρδιακή φλεγμονή.

Αν και τα κλασικά TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια προκαλούν ενεργοποίηση του NF-κB και οδηγούν περαιτέρω στην έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου και ανάρρωση του διαστήματος ST έχουν αυξημένη έκφραση μιας σειράς γονιδίων ενεργοποίησης του NF-κB όπως, HIF-1α (hypoxia-inducible factor-1α), NF-κB1α, IL-18R1/2, μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 και IL-8, και

μειωμένη έκφραση γονιδίων ενεργοποίησης του TNF-α [247]. Ως εκ τούτου, εκτός από τα δύο κλασικά TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια, μπορεί να υπάρχει ένα εναλλακτικό HIF-1-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι, οι ακριβείς μηχανισμοί του οποίου δεν έχουν καθοριστεί.

**γ. Μυοκαρδιακή βλάβη από ισχαιμία / επαναιμάτωση:** Πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια αποκάλυψαν ότι τα επίπεδα έκφρασης TLR4 και NF-κΒ αυξάνονται σημαντικά τόσο στην ισχαιμική ζώνη όσο και στην περιοχή σε κίνδυνο και ότι προκαλείται απόπτωση μυοκαρδιακών κυττάρων κατά την πρώιμη φάση μετά από βλάβη ισχαιμίας / επαναιμάτωσης [248, 249]. Κατά την όψιμη περίοδο τα επίπεδα TLR4 και προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών αυξάνονται σημαντικά και πάλι, οδηγώντας σε αναδιαμόρφωση και δυσλειτουργία του τραυματισμένου κοιλιακού μυοκαρδίου [250].

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι αναστέλλοντας τα TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια μπορεί να μετριάζεται η φλεγμονώδης απόκριση και η απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων μετά από μυοκαρδιακή βλάβη ισχαιμίας / επαναιμάτωσης. Η pterostilbene, μια ουσία που σχετίζεται χημικά με τη ρεσβερατρόλη, το πρωταρχικό αντιοξειδωτικό συστατικό των βατόμουρων, μειώνει την παραγωγή TNF-α μέσω καταστολής των TLR4-NF-κΒ σηματοδοτικών μονοπατιών, αναστέλλοντας αποτελεσματικά τη διήθηση από ουδετερόφιλα, τη φλεγμονώδη απόκριση και την απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων μετά από βλάβη ισχαιμίας / επαναιμάτωσης [251]. Επιπλέον, οι κυτταροκίνες που επάγονται από τους TLR4 και τα σχετικά μονοπάτια, όπως ο TNF-α και η IL-6, ρυθμίζουν την απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων [252].

Ορισμένοι συνδέτες TLR4 ή των παρακάτω του γονιδίων μπορεί να λειτουργούν ως επαγωγείς της ισχαιμικής προετοιμασίας του μυοκαρδίου, ενισχύοντας την αντίσταση στη βλάβη ισχαιμίας / επαναιμάτωσης. Ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε ενδοφλέβια εριτοράνη, ένας ανταγωνιστής του TLR4, για 10 λεπτά πριν από ισχαιμία / επαναιμάτωση εμφάνισαν σημαντικά μικρότερο έμφρακτο [253]. Ομοίως, προετοιμασία με follistatin μπορεί να μειώσει σημαντικά την απόπτωση των επιθηλιακών, ενδοθηλιακών και μυοκαρδιακών κυττάρων που οφείλεται σε μυοκαρδιακή βλάβη από ισχαιμία / επαναιμάτωση

μέσω αναστολής του MyD88-εξαρτώμενου μονοπατιού [254]. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν ότι οι TLR4 και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εκκινούν μπορεί να αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους και ότι η ισχαιμική προετοιμασία με αυτά τα μόρια μπορεί να μειώσει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα που συνδέεται με το έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Είναι ενδιαφέρον, ότι τα επίπεδα της ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB ή Akt) είναι σημαντικά αυξημένα στο μυοκάρδιο TLR4-ανεπαρκών ποντικών σε σύγκριση με ποντίκια άγριου-τύπου μετά από βλάβη ισχαιμίας / επαναιμάτωσης [255, 256], γεγονός που υποδηλώνει ότι το PI3K/Akt σηματοδοτικό μονοπάτι μπορεί να ενεργεί ως αντισταθμιστικός ρυθμιστής στη μυοκαρδιακή φλεγμονή. Η χορήγηση αναστολέων κινάσης PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) καταργεί εντελώς την καρδιοπροστασία στα TLR4-ανεπαρκή ποντίκια μετά από βλάβη ισχαιμίας / επαναιμάτωσης [256]. Επιπλέον, η φωσφορική γλυκάνη, ένας συνδέτης του TLR4, μπορεί να μετατοπίσει τα TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια από ένα κυρίως NF-κB μονοπάτι σε PI3K/Akt σηματοδοτικό μονοπάτι, με προστατευτικό ρόλο στη μυοκαρδιακή βλάβη από ισχαιμία / επαναιμάτωση [257]. Οι σχετικοί μηχανισμοί μπορεί να περιλαμβάνουν TLR4 ενεργοποίηση που οδηγεί σε φωσφορυλίωση της τυροσίνης του τμήματος TIR. Στη συνέχεια το τμήμα TIR διαχωρίζεται από τον MyD88, συνδέει τη ρυθμιστική υπομονάδα p85 της PI3K και φωσφορυλιώνει την Akt. Κατόπιν, η ενεργοποιημένη Akt προωθεί την επιβίωση και αναστέλλει την απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι υπάρχει αμοιβαία ρύθμιση μεταξύ του NF-κB και του PI3K/Akt σηματοδοτικού μονοπατιού κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής βλάβης από ισχαιμία / επαναιμάτωση.

**δ. Καρδιακή Ανεπάρκεια και Μυοκαρδιακή Αναδιαμόρφωση:** Η σύνδεση μεταξύ καρδιακής ανεπάρκειας και φλεγμονής πρωτοαναφέρθηκε ήδη από το 1990 [258], όταν διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του παράγοντα Νέκρωσης των όγκων (TNF) ήταν αυξημένα στη σοβαρή χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. Αργότερα, μια σειρά από μελέτες έδειξαν ότι, εκτός από τον TNF και άλλες προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χυμοκίνες εμπλέκονται

επίσης στην εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας [259, 260]. Πρόσφατες κλινικές και πειραματικές μελέτες προτείνουν ότι οι TLR μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας [261]. Σε τομές ιστού από καρδιές ανθρώπων με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια και τρωκτικών με πειραματική καρδιακή ανεπάρκεια παρατηρείται αυξημένη έκφραση TLR4. Επίσης, ποντίκια με μετάλλαξη του TLR4 είχαν μειωμένη αναδιαμόρφωση και καλύτερα διατηρημένη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η διάμεση ίνωση και η μυοκαρδιακή υπερτροφία μειώθηκαν στη μη-εμφραγματική περιοχή στα ποντίκια με μετάλλαξη του TLR4. Η έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών μειώθηκε και η πυκνότητα κολλαγόνου αυξήθηκε στην περιοχή του εμφράκτου σε TLR4 μεταλλαγμένα ποντίκια [262]. Αυτά τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ο TLR4 μπορεί να αποτελέσει εφικτό στόχο στη θεραπεία της ισχαιμικής καρδιακής ανεπάρκειας.

Υπάρχουν στοιχεία ότι οι TLR μπορεί να διαδραματίζουν ένα ρόλο στην κλινική καρδιακή ανεπάρκεια. Έχει αναφερθεί αύξηση τόσο του TLR4 όσο και του υποδοχέα της IL-1 στο μυοκάρδιο ασθενών με σοβαρή επιδείνωση της καρδιακής ανεπάρκειας που στη συνέχεια απαιτήθηκε εμφύτευση συσκευής υποβοήθησης της αριστερής κοιλίας (LVAD) [263]. Ασθενείς με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια έχουν μεγαλύτερη TLR4 mRNA έκφραση, σε σύγκριση με εκείνους με ισχαιμική καρδιακή νόσο. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι ενώ τα επίπεδα έκφρασης του TLR4 μειώνονται σε καρδιές ασθενών με διατακτική, ισχαιμική και ιογενή μυοκαρδιοπάθεια, τα επίπεδα έκφρασης των παρακάτω μεσολαβητών TIRAP και IRAK-4 είναι αυξημένα [264]. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι μια δυσπροσαρμοστική έμφυτη ανοσολογική αντίδραση μπορεί να συμβάλει στην παθογένεια της καρδιακής ανεπάρκειας μέσα από διαρκή έκφραση των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών.

**ε. Αθηροσκλήρωση:** Κλινικά και πειραματικά στοιχεία υποστηρίζουν τον κεντρικό ρόλο του TLR4 στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Κύτταρα αθηροσκληρωτικών πλακών, εκφράζουν τον TLR4 [265]. Τα επίπεδα TLR4 ρυθμίζονται από την oxLDL και σε μοντέλα ποντικών ο TLR4 είναι απαραίτητος

διαμεσολαβητής για την επαγόμενη από την oxLDL διαφοροποίηση των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα [266]. Ομοίως, ο TLR4 είναι ένας κρίσιμος διαμεσολαβητής στην επαγόμενη από την oxLDL έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα [267]. Η ελάχιστα τροποποιημένη LDL (ένας υποτύπος της oxLDL βασικός στην αθηροσκλήρωση) προκαλεί την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και κυτταροσκελετικών αλλαγών στα μακροφάγα μέσω της ενεργοποίησης του TLR4 και του MyD88-ανεξάρτητου σηματοδοτικού μονοπατιού [268, 269]. Η σπληνική τυροσινική κινάση SYK συνδέεται με τον κυτταροπλασματικό τομέα του TLR4 και προκαλεί την ενεργοποίηση των μακροφάγων, την πύχωση της κυτταρικής μεμβράνης, τη μακροπίνωση και τη συσσώρευση λιπιδίων, και την επακόλουθη μεταμόρφωση τους σε έμφορτα λιπιδίων αφρώδη κύτταρα [270, 271].

Περαιτέρω πειραματικά στοιχεία από ζωικά μοντέλα υποστηρίζουν το ρόλο του TLR4 στην αθηροσκλήρωση. Σε ApoE<sup>-/-</sup> ποντίκια με προδιάθεση για αθηροσκλήρωση απώλεια του TLR4 ή της MyD88 οδηγεί σε εξασθένηση της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης μέσω της αναστολής της συσσώρευσης μακροφάγων καθώς και της έκκρισης κυτταροκινών [272, 273]. Ο TLR4 συμβάλλει στην πρώιμη φάση της αθηροσκλήρωσης στη σύσφιξη αφρωδών κυττάρων στην αορτή ApoE<sup>-/-</sup> TLR4<sup>-/-</sup> ποντικίων, με 75% μείωση στα επίπεδα των λιπιδίων στον έσω χιτώνα σε σύγκριση με ApoE<sup>-/-</sup> ποντίκια [274]. Ποντίκια που δεν έχουν μακροφάγα που εκφράζουν TLR4, παρουσιάζουν μείωση του μεγέθους των αθηροσκληρωτικών βλαβών όταν τρέφονται με δίαιτα χαμηλή σε λιπαρά, παρά την απουσία διαφοράς στα λιπίδια του πλάσματος [275].

Ο TLR4 εμπλέκεται επίσης στην αρτηριακή αναδιαμόρφωση, μια διαδικασία που αντισταθμίζει την απώλεια του αγγειακού αυλού λόγω της αύξησης της αθηρωματικής πλάκας και περιλαμβάνει την αποικοδόμηση του κολλαγόνου της διάμεσης ουσίας από την μεταλλοπρωτεϊνάση-9 (MMP-9), η οποία ενεργοποιείται από τον TLR4 [276]. Η αρτηριακή αναδιαμόρφωση συμβάλλει στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και την αγγειακή επαναστένωση [277]. Εκτός από την ανάπτυξη του αθηρώματος, ο TLR4 διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και τη ρήξη των αθηροσκληρωτικών πλακών που



οδηγούν στο σχηματισμό θρόμβου. Με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έχει διαπιστωθεί αυξημένη έκφραση του TLR4 στα μακροφάγα σε ραγείσες αθηροσκληρωτικές πλάκες στεφανιαίων αρτηριών [278]. Ο TLR4 εμπλέκεται επιπλέον στην αστάθεια της πλάκας. Συγκεκριμένα συστατικά της oxLDL που συσσωρεύεται στις αθηρωματικές πλάκες ενισχύουν την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και τη δραστικότητα της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB [279]. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν άμεσα το ρόλο των λιπιδικών παραγώγων ως ενδογενών συνδετών του TLR4 που συμβάλλουν στη διάσπαση της μεσοκυττάριας ουσίας.

Η μεσοκυττάρια ουσία είναι βασικός παράγοντας στην εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής νόσου, και αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει τις δομικές μεταβολές που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της αθηροσκλήρωσης [280, 281]. Σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής παράγονται πρωτεΐνες στη μεσοκυττάρια ουσία, που ρυθμίζουν τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων και άλλων ανοσολογικών κυττάρων στην περιοχή της βλάβης. Ενώ το υγιές ενδοθήλιο στηρίζεται σε μεσοκυττάρια ουσία που αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV και λαμινίνη, το ενδοθήλιο των αθηροσκληρωτικών αγγείων περιέχει άφθονη φιβρονεκτίνη [282, 283]. Η φιβρονεκτίνη εμφανίζεται σε δύο μορφές, τη φιβρονεκτίνη του πλάσματος (pFN), ένα διαλυτό διμερές που εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα και την κυτταρική φιβρονεκτίνη (cFN), που εκφράζεται στην μεσοκυττάρια ουσία διαφόρων ιστών και είναι ένα πολυμερές που σχηματίζει ινίδια [284]. Η κυτταρική φιβρονεκτίνη συντίθεται από τα αγγειακά λεία μυϊκά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προωθεί την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης μέσω της TLR4 σηματοδότησης, που οδηγεί σε προσέλκυση μακροφάγων στην αθηρωματική πλάκα και περαιτέρω επίταση της χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης [285]. Οι TLR4 των αιμοπεταλίων διευκολύνουν τις προθρομβωτικές επιδράσεις της κυτταρικής φιβρονεκτίνης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την αρτηριακή θρόμβωση [286]. Ποντίκια των οποίων τα αιμοπετάλια στερούνται TLR4 έδειξαν μειωμένο σχηματισμό και βραδύτερη αύξηση του θρόμβου σε σύγκριση με ποντίκια μάρτυρες των οποίων τα αιμοπετάλια εκφράζουν TLR4, υποστηρίζοντας περαιτέρω το προαθηρογόνο αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης φιβρονεκτίνης - TLR4.

**ζ. Πολυμορφισμοί του TLR4 και ισχαιμική καρδιοπάθεια:** Η δραστικότητα και η λειτουργία των TLR4 φαίνεται να διαφοροποιούνται από γενετικές παραλλαγές, και ειδικά από πολυμορφισμούς SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) [287]. Οι δύο SNPs για τον TLR4 με συχνότητα μεγαλύτερη του 5% στον άνθρωπο είναι Asp299Gly (+ 896A/G, rs4986790) και Thr399Ile (+1196 C/T, rs4986791). Όπως και οι περισσότερες μεταλλάξεις, ο πολυμορφισμός Asp299Gly εντοπίζεται στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα με τις επαναλαμβανόμενες, πλούσιες σε λευκίνη αλληλουχίες, που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση των PAMPs (π.χ. mmLDL) [288].

Λόγω της αντικατάστασης του ασπαρτικού οξέος από το αμινοξύ γλυκίνη στη θέση 299 (αντικατάσταση νουκλεοτιδίου 896A > G), αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση του εξωκυττάριου τμήματος του TLR4, οδηγώντας σε αμβλυμένη απόκριση σε εισπνεόμενους LPS και μειωμένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών [289], καθώς και πιθανά μειωμένο κίνδυνο για την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης [290]. Πολυάριθμες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη συσχέτιση του πολυμορφισμού Asp299Gly του TLR4 και της Στεφανιαίας Νόσου. Ορισμένες αναφορές υποδεικνύουν μια προστατευτική επίδραση του πολυμορφισμού Asp299Gly στη ΣΝ [216, 287, 291 - 293]. Αντίθετα, μια μελέτη διαπίστωσε ότι οι άνδρες με γονότυπο TLR4 299Gly είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφράγματός του μυοκαρδίου [219], ενώ άλλες μελέτες δεν έδειξαν καμία προφανή σχέση μεταξύ 299Gly και ΣΝ [218, 294 - 302]. Επίσης, αρκετές μελέτες που εξέτασαν μια πιθανή σχέση μεταξύ της σοβαρότητας των στενώσεων των στεφανιαίων αρτηριών και του πολυμορφισμού Asp299Gly, κατέληξαν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα [291, 299, 302 - 304]. Επιπλέον, ο φαινότυπος 299Gly μπορεί να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα των στατινών στην πρόληψη των καρδιαγγειακών συμβαμάτων και ως εκ τούτου οι φορείς του πολυμορφισμού μπορεί να επωφελούνται σημαντικά από θεραπεία με στατίνη [291]. Ωστόσο, το φαινόμενο δεν επιβεβαιώνεται από όλους τους ερευνητές [292, 298]. Επιπλέον, η C - αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), που αποτελεί χρήσιμο βιοδείκτη φλεγμονωδών νόσων και θεωρείται επίσης ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου καρδιαγγειακών επεισοδίων, έχει λάβει μεγάλη προσοχή σε άτομα με τον πολυμορφισμό Asp299Gly. Αρκετές μελέτες για τη σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού Asp299Gly, των επιπέδων CRP και

της στεφανιαίας νόσου κατέληξαν σε αντιφατικά αποτελέσματα [216, 219, 290, 298, 304, 305].

**στ. Πολυμορφισμοί του TLR4 και η σχετιζόμενη με τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 Ισχαιμική Καρδιοπάθεια:** Ο υποδοχέας TLR4 και οι πολυμορφισμοί του έχουν συνδεθεί με διάφορες διαταραχές συμπεριλαμβανομένου και του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2). Ο ΣΔ2 είναι μια ασθένεια με παγκόσμια εξάπλωση και σταθερά αυξανόμενο επιπολασμό στις δυτικές κοινωνίες [306, 307]. Διάφοροι παράγοντες κινδύνου έχουν συσχετιστεί με την έναρξη του ΣΔ2, όπως το οικογενειακό ιστορικό ΣΔ, η εθνικότητα, η παχυσαρκία και οι πολυκυστικές ωοθήκες [307 - 310]. Ωστόσο, μόνο λίγοι παράγοντες έχουν βρεθεί να προσφέρουν προστασία έναντι του ΣΔ2 και των επιπλοκών του όπως νεφροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια και ισχαιμική καρδιοπάθεια [292, 307 - 310]. Αυξημένη ρύθμιση των επιπέδων TLR4 έχει συσχετιστεί με την αυξημένη φλεγμονώδη ανταπόκριση που καταγράφεται στο ΣΔ2 [311] και έχει προταθεί ως ο σύνδεσμος μεταξύ φλεγμονής και αθηροσκλήρωσης σε διαβητικούς ασθενείς [312]. Όσον αφορά τις γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με τον TLR4, έχει προταθεί ότι ο πολυμορφισμός Asp299Gly προσδίδει προστασία έναντι του ΣΔ2 [292], καθώς και της διαβητικής νευροπάθειας [235β], ενώ ο πολυμορφισμός Thr399Ile έναντι της διαβητικής νευροπάθειας μόνο [313]. Αντίθετα, η ταυτόχρονη παρουσία των δύο πολυμορφισμών έχει συνδεθεί με την πρώιμη έναρξη της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας [314]. Έχει προταθεί ότι οι δύο πολυμορφισμοί μπορεί να σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της ισχαιμικής καρδιακής νόσου, αν και τα αποτελέσματα από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία είναι αντιφατικά [216, 218, 315].

## Κεφάλαιο 2 Σχεδιασμός και Μέθοδοι

Προκειμένου λοιπόν να μελετήσουμε τον πιθανό προστατευτικό ρόλο των συνήθων πολυμορφισμών Asp299Gly και Thr399Ile του TLR4 έναντι της σχετιζόμενης με το διαβήτη ισχαιμικής καρδιοπάθειας, εξετάσαμε την κατανομή τους τόσο σε διαβητικούς όσο και σε μη διαβητικούς ασθενείς με και χωρίς ισχαιμική καρδιοπάθεια.

### 2.1 Πληθυσμός μελέτης:

Πραγματοποιήθηκε γονοτυπική ανίχνευση των υπό μελέτη πολυμορφισμών του υποδοχέα TLR4, Asp299Gly ή D299G (MIM603030.001) και Thr399Ile ή T399I (MIM 603030.002), σε 699 άτομα συνολικά: 286 με ΣΔ2 και 413 χωρίς ΣΔ2 (μάρτυρες). Από τους 286 διαβητικούς ασθενείς, 142 διαγνώστηκαν επίσης με ΙΚΠ, σε σύγκριση με 145 από τους 413 μάρτυρες. Όλες οι ομάδες ήταν αντίστοιχες ως προς το φύλο, την ηλικία και το κάπνισμα ( $P > 0,1$  σε όλες τις περιπτώσεις). Οι ασθενείς με ΣΔ2 και ισχαιμική καρδιοπάθεια εντάχθηκαν στη μελέτη και παρακολουθήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, Ελλάδα. Η υπόλοιπη ομάδα ελέγχου χωρίς ισχαιμική καρδιοπάθεια αποτελούνταν από 268 τυχαία επιλεγμένους υγιείς δότες αίματος. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων στη μελέτη συνοψίζονται στον Πίνακα 3. Η διάγνωση του ΣΔ2 βασίστηκε στα κριτήρια της Αμερικανικής Διαβητολογικής Εταιρείας [316], ενώ για τους συμμετέχοντες με ισχαιμική καρδιοπάθεια η διάγνωση στηρίχθηκε σε αγγειογραφική τεκμηρίωση, τα κριτήρια του Αμερικανικού Κολλεγίου Καρδιολογίας (American College of Cardiology) [317] και της Κοινής Επιτροπής Ευρωπαϊκής Εταιρείας Καρδιολογίας και του Αμερικανικού Κολλεγίου Καρδιολογίας (Joint ESC / ACC Committee criteria) [318] ( Πίνακας 4). Δεν συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με σταθερή στηθάγχη. Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν Καυκάσιοι, κάτοικοι της κεντρικής Ελλάδας (Θεσσαλία).

**Πίνακας 3.** Δημογραφικά στοιχεία, κλινικά χαρακτηριστικά και τιμές εργαστηριακών εξετάσεων των ομάδων της μελέτης. Οι τιμές παρουσιάζονται ως απόλυτοι αριθμοί ή μέσοι όροι  $\pm$  SD. ΣΔ 2: σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, ΙΚΠ: ισχαιμική καρδιοπάθεια, ΔΜΣ: δείκτης μάζας σώματος.

	ΣΔ 2		Ομάδα Ελέγχου	
	ΙΚΠ	Χωρίς ΙΚΠ	ΙΚΠ	Χωρίς ΙΚΠ
Ηλικία (έτη)	63,1 $\pm$ 5,4	62,3 $\pm$ 5,7	62,4 $\pm$ 5,2	62,2 $\pm$ 5,1
Φύλο				
Άνδρες	81	82	92	175
Γυναίκες	61	62	53	93
Κάπνισμα				
Ναι	74	70	78	123
Όχι	68	74	67	135
Υπέρταση				
Ναι	86	85	103	187
Όχι	56	59	42	81
ΔΜΣ (kg / m <sup>2</sup> )	26,2 $\pm$ 3,3	25,8 $\pm$ 3,5	25,1 $\pm$ 3	25,2 $\pm$ 3,2
Διάρκεια ΣΔ 2 (έτη)	12,9 $\pm$ 4,4	12,1 $\pm$ 4,3	-	-
Οικογενειακό ιστορικό ΙΚΠ				
Ναι	65	63	53	90
Όχι	77	81	92	178
Χοληστερόλη (mmol / l)	5.18 $\pm$ 0.57	5.1 $\pm$ 0.6	5.21 $\pm$ 0.62	5.13 $\pm$ 0.64
HDL (mmol / l)	0,97 $\pm$ 0,16	1 $\pm$ 0.18	1,06 $\pm$ 0,17	1,08 $\pm$ 0,19
LDL (mmol / l)	2,7 $\pm$ 0,26	2,69 $\pm$ 0,2	2.73 $\pm$ 0.18	2,7 $\pm$ 0,2
Τριγλυκερίδια (mmol / l)	1,9 $\pm$ 0,1	1,89 $\pm$ 0,17	1,85 $\pm$ 0,19	1,84 $\pm$ 0,2
HbA1c *	0,077 $\pm$ 0,006	0,076 $\pm$ 0,007	0,045 $\pm$ 0,012	0,046 $\pm$ 0,014

\* Αναλογία συνολικής αιμοσφαιρίνης.

	ΣΔ 2		Ομάδα Ελέγχου	
	ΙΚΠ	Χωρίς ΙΚΠ	ΙΚΠ	Χωρίς ΙΚΠ
Γλυκόζη (mmol / l)	8,8 ± 1,1	8,7 ± 1,1	5 ± 1	4,8 ± 1,09
Θεραπεία με στατίνες				
Ναι	84	48	97	32
Όχι	58	96	48	236

**Συνέχεια πίνακα 3.**

**Πίνακας 4.** Διαγνωστικά Κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον ΣΔ 2 και την ΙΚΠ.

---

### **Διαγνωστικά κριτήρια ΣΔ2**

#### Κριτήρια ADA (ένα από τα ακόλουθα)

Γλυκόζη πλάσματος νηστείας > 7 mmol / l

Συμπτώματα υπεργλυκαιμίας και τυχαίας γλυκόζης στο πλάσμα > 11,1 mmol / l

Γλυκόζη πλάσματος > 11,1 mmol / l στις 2 ώρες μετά από δοκιμασία ανοχής γλυκόζης από του στόματος

### **Διαγνωστικά κριτήρια ισχαιμικής καρδιοπάθειας**

#### Αγγειογραφική τεκμηρίωση

≥50% στένωση της διαμέτρου του αυλού των στεφανιαίων αρτηριών (αριστερός πρόσθιος κατιών κλάδος, περισπώμενος κλάδος και δεξιά στεφανιαία αρτηρία)

Ενδοστεφανιαίοι θρόμβοι

Σύνθετες βλάβες

#### ACC κριτήρια

Ασταθής στηθάγχη

Στηθάγχη ή ισοδύναμο ισχαιμικής δυσφορίας, απουσία βιοχημικών ενδείξεων μυοκαρδιακής νέκρωσης, συνοδευόμενη από:

Στηθάγχη σε ηρεμία για > 20 λεπτά ή

Νέα εκδήλωση στηθάγχης τουλάχιστον κατηγορίας III της κατηγορίας CCS ή

Πρόσφατη επιδείνωση στηθάγχης που αντικατοπτρίζεται από την αύξηση της σοβαρότητας τουλάχιστον 1 κατηγορία κατά CCS τουλάχιστον σε κατηγορία III κατά CCS

#### Κοινά κριτήρια της επιτροπής ESC / ACC

Οξύ, εξελισσόμενο και πρόσφατο Έμφραγμα Μυοκαρδίου (ένα από τα ακόλουθα)

Τυπική ανύψωση και σταδιακή πτώση (troponin) ή ταχύτερη άνοδος και πτώση (CK-MB) βιοχημικών δεικτών συμβατών με μυοκαρδιακή νέκρωση που συνοδεύεται είτε από:

Ισχαιμικά συμπτώματα ή

Ανάπτυξη παθολογικών κυμάτων Q (HKΓ)

Αλλαγές στο HKΓ ενδεικτικές ισχαιμίας (ανύψωση / κατάσπαση του διαστήματος ST)

Παρέμβαση σε στεφανιαία αρτηρία (π.χ. αγγειοπλαστική)

#### **Συνέχεια πίνακα 4.**

Παθολογοανατομικά ευρήματα του εμφράγματος μυοκαρδίου

Εγκατεστημένο έμφραγμα μυοκαρδίου (ένα από τα ακόλουθα)

Ανάπτυξη νέων παθολογικών κυμάτων Q σε διαδοχικά ΗΚΓ με ή χωρίς προηγούμενα συμπτώματα. Οι βιοχημικοί δείκτες μυοκαρδιακής νέκρωσης μπορεί να βρίσκονται εντός φυσιολογικού εύρους.

Παθολογοανατομικά ευρήματα επουλωμένου εμφράγματος μυοκαρδίου

---

ΣΔ 2: σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, ΙΚΠ: ισχαιμική καρδιοπάθεια, ADA: American Diabetes Association, CCS: Canadian Cardiovascular Society, ESC: European Society of Cardiology, ACC: American College of Cardiology, CK-MB: μυοκαρδιακό ισοένζυμο κρεατινικής κινάσης, ΗΚΓ: ηλεκτροκαρδιογράφημα.



## 2.2 Εργαστηριακό Μέρος: Μεθοδολογία & Πρωτόκολλα

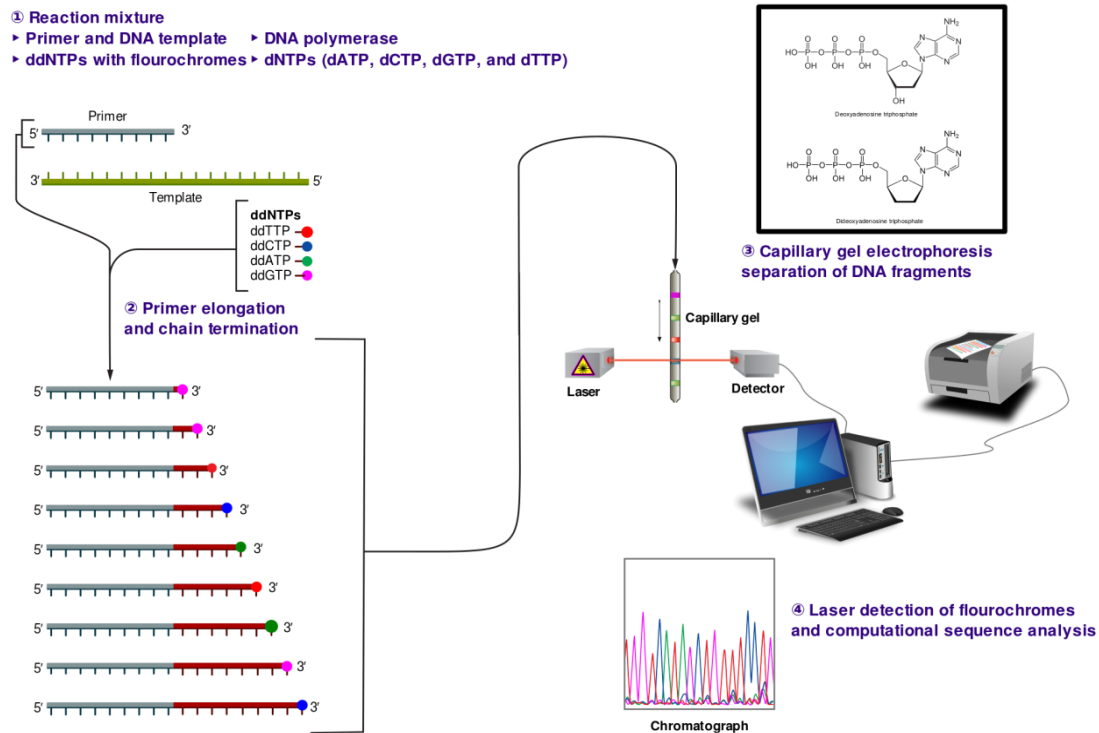
### 2.2.1 Διαδικασία Γονοτυπικής Ανάλυσης Επιγραμμικά

**Απομόνωση DNA.** Το γονιδιωματικό DNA εκχυλίστηκε από 200 μl περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας το QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

**PCR ενίσχυση.** Ένα θραύσμα μήκους 438 bp που περιέχει τόσο TLR4 Asp299Gly και πολυμορφισμοί Thr399Ile ενισχύθηκαν από γονιδιωματικό DNA. Ειδικές αλληλουχίες ζευγών εκκινητών σχεδιάστηκαν με λογισμικό Primer 3 ([www.jstbio.com](http://www.jstbio.com)): προς τα εμπρός 5'-TCTAGAGGGCCTGTGCAATT-3' και αντίστροφο 5'-TGAAACTCACTCATTTGTTTTCAA-3'. Τα μίγματα αντίδρασης PCR περιείχαν 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM από κάθε dNTP, 1,5 U Taq υNA πολυμεράση (In Vitrogen) και 15 pmol από κάθε εκκινητή. Τα προϊόντα ενίσχυσης που παράχθηκαν μετά από 35 κύκλους μετουσίωσης DNA στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα, ξαναζευγαρώματος στους 55 °C για 30 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα σε PTC-200 MJ Research Thermocycler (MJ Research, Inc., Waltham, MA , ΗΠΑ).

**Ανάλυση αλληλουχίας.** Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR διεξήχθη χρησιμοποιώντας το κιτ καθαρισμού PureLink PCR (Invitrogen). Η αυτοματοποιημένη αλληλουχία κύκλων πραγματοποιήθηκε με αμφοτέρους τους κλώνους σε έναν αναλυτή Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας το κιτ προσδιορισμού αλληλουχίας Cycle Sequencing BigDye Terminator (Applied Biosystems). Οι αλληλουχίες ευθυγραμμίσθηκαν σε σχέση με τις αλληλουχίες ελέγχου από GenBank (αριθμός πρόσβασης GenBank: NM 138554), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Sequencer PC (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA) και εξετάστηκαν για την παρουσία μεταλλαγών.

**Αλληλούχιση DNA κατά Sanger** Το προϊόν PCR των δειγμάτων της μελέτης μήκους 438bp του εξονίου 3 του γονιδίου *TLR-4* που επεκτάθηκε με το ζεύγος εκκινήτων 5'-TCTAGAGGGCCTGTGCAATT-3' και 5'-TGAAACTCACTCATTTGTTTCAA-3' σύμφωνα με μεθοδολογία και πρωτόκολλα που περιγράφηκαν διεξοδικά στις εκθέσεις προόδου, απεστάλη για αλληλούχιση (sequencing) σε εξωτερικό εργαστήριο (CeMIA SA), όπου ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA γίνεται με τη μέθοδο Sanger προκειμένου να ανιχνευθούν πολυμορφισμοί στα κλινικά δείγματα. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας γίνεται σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης DNA ABI Prism 3700 Automated Sequencer (PE Biosystems) και προκύπτει απευθείας η παρουσία ή απουσία νουκλεοτιδικών μεταβολών στις αναμενόμενες θέσεις από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης. Το DNA αποδιατάσσεται και κάθε μονόκλωνη αλυσίδα λειτουργεί ως εκμαγείο και υποβάλλεται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις πολυμερισμού. Σε κάθε αντίδραση υπάρχουν ένα εκ των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων σε χαμηλή συγκέντρωση, καθώς επίσης και υψηλότερες συγκεντρώσεις των φυσιολογικών τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων. Σε κάθε αντίδραση το εκάστοτε διδεοξυριβονουκλεοσίδιο ενσωματώνεται τυχαία σε θέση του αντίστοιχου δεοξυριβονουκλεοσιδίου. Αυτή η προσθήκη του διδεοξυριβονουκλεοσιδίου οδηγεί στον τερματισμό του πολυμερισμού καθώς η απουσία της 3'-υδροξυλομάδας εμποδίζει την προσθήκη επόμενου νουκλεοτιδίου. Τα νεοσυντιθέμενα τμήματα διαχωρίζονται μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και ανιχνεύονται με τη χρήση φθοριοχρωμάτων με τα οποία είναι σημασμένα τα διδεοξυριβονουκλεοσίδια μέσω laser σε αυτόματο αναλυτή. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων από την αλληλούχιση του DNA και ο προσδιορισμός της ύπαρξης ή μη των πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Chromas (Technelysium).



**Εικόνα 8.** Αλληλούχιση DNA με τη μέθοδο Sanger (WikimediaCommons).

## 2.3 Συνήθειες εργαστηριακές εξετάσεις

Τα επίπεδα HbA1c υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη συσκευή DCA 2000 (Bayer Corporation). Τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) και τριγλυκεριδίων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας μια ενζυματική χρωματομετρική ανάλυση και εμπορικά διαθέσιμα κιτ (Olympus Diagnostics, GmbH, Αμβούργο, Γερμανία), ενώ για λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) εφαρμόστηκε ο τύπος του Friedewald.

## 2.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση περιέλαβε τη χρήση Student's  $t$ ,  $\chi^2$  (για να αποκλειστούν οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg), Fisher exact και ANOVA test. Αντί για τη χρήση της παραμέτρου  $D$ , μια εκτίμηση της ισορροπίας σύνδεσης, που τείνει να επηρεαστεί από τη συχνότητα των αλληλόμορφων, υπολογίστηκε ένας συντελεστής συσχέτισης  $r$  μεταξύ των εξεταζόμενων τόπων, χρησιμοποιώντας την εξίσωση  $r = D/\sqrt{\text{γινόμενο των}}$

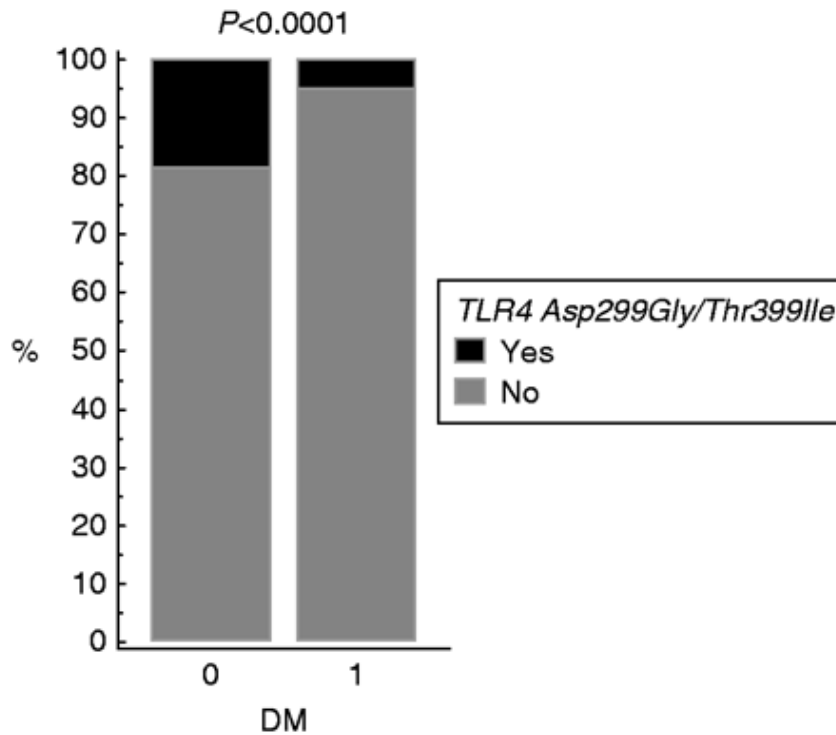
συχνοτήτων αλληλομόρφων. Κατά τη σύγκριση, κάθε φορά που ένα επίπεδο σπουδαιότητας  $P < 0.05$  καταγράφηκε σε μονοπαραγοντική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε ακολούθως πολυπαραγοντική ανάλυση. Οι πολυπαραγοντικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση, λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα, το οικογενειακό ιστορικό ισχαιμικής καρδιοπάθειας, το δείκτη μάζας σώματος (BMI), την υπέρταση, την τιμή HbA1c, των λιποπρωτεΐνων και των τριγλυκεριδίων, τη θεραπεία με στατίνες καθώς και τη διάρκεια του διαβήτη. Λόγω του γεγονότος ότι οι ασθενείς ήταν συχνά σε φαρμακευτική αγωγή με περισσότερους από έναν αντιυπερτασικούς / αντιδιαβητικούς παράγοντες ή άλλαξαν από έναν παράγοντα σε άλλο, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πιο ακριβής δυνατή ανάλυση, οι διάφοροι αυτοί παράγοντες εξετάστηκαν λαμβάνοντας επίσης υπόψη την περίοδο ή διάρκεια της θεραπείας με κάθε φάρμακο. Ωστόσο, αυτό οδήγησε σε μεγάλη ετερογένεια και κατά τη διάρκεια της στατιστικής ανάλυσης, χαμηλή συνολική απόδοση μοντέλου. Έτσι, οι ισχυρότεροι «προγνωστικοί παράγοντες» (ή συγχυτικοί παράγοντες) στη στατιστική μας ανάλυση, η υπέρταση, όχι οι αντι-υπερτασικές θεραπείες και η παρουσία / απουσία ΣΔ 2 και της ρύθμισης του ΣΔ 2, που αντανακλάται στα επίπεδα HbA1c, συμπεριλήφθηκαν τελικά, αποδίδοντας τον καλύτερο δυνατό συντελεστή συσχέτισης  $R^2$ . Οι αναλύσεις που περιγράφηκαν παραπάνω πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό λογισμικό MedCalc 10.2.0.0 (MedCalc Software bvba, Mariakerke, Βέλγιο). Επίσης, εκτιμήθηκε (με τη χρήση του CaTS 0.0.2 power calculator) ότι με βάση το τρέχον μέγεθος και την αναλογία ασθενών – μαρτύρων του υπό μελέτη πληθυσμού, η ανίχνευση των διαφορών στην κατανομή μεταλλαγμένων αλληλόμορφων, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με ισχύ που υπερβαίνει το 80% ( $\approx 96\%$ ) στο επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

## 2.5 Ηθική και Δεοντολογία

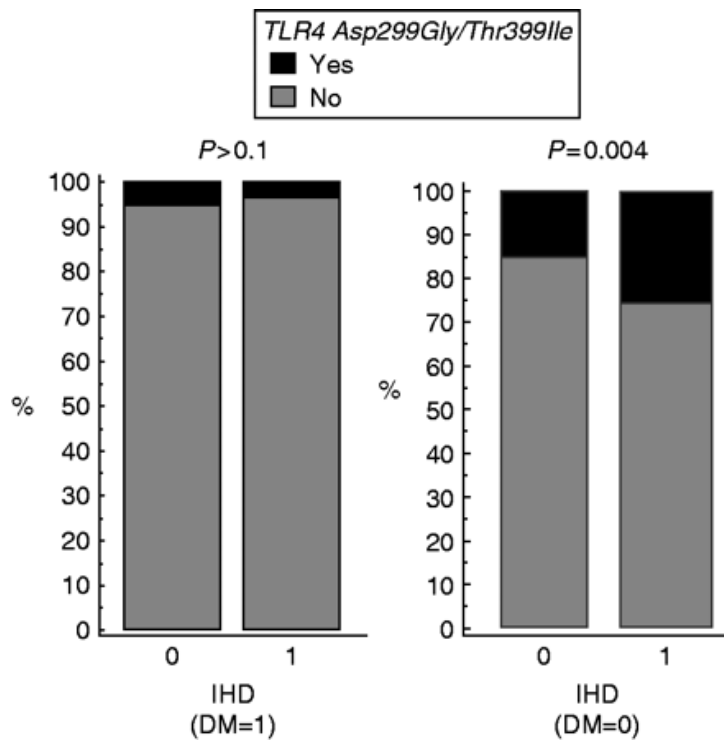
Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Συγκατάθεση μετά από ενημέρωση λήφθηκε από όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη.

### Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα

Οι μεταλλάξεις του υποδοχέα TLR4, Asp299Gly και Thr399Ile, ανιχνεύθηκαν σε 94/699 άτομα (13,4% του πληθυσμού μελέτης). Τα μελετώμενα μόρια βρέθηκαν να είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Οι σχετικές συχνότητες και των δύο αλληλόμορφων ήταν 15/286 στους ασθενείς με ΣΔ 2 και 79/413 στην ομάδα ελέγχου [λόγος πιθανοτήτων (OR): 0,23, 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI): 0,13-0,42,  $P < 0,0001$ , εικόνα 9]. Όταν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα μελετήθηκαν στον πληθυσμό μας, ενώ αξιολογήθηκε μόνο η παρουσία ή η απουσία ισχαιμικής καρδιοπάθειας, καταγράφηκε μια τάση διαφοράς μεταξύ των ατόμων με (46/287) και χωρίς ισχαιμική καρδιοπάθεια (48/412) (OR: 1,45, 95% CI : 0,94-2,24,  $P = 0,1$ ). Η κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων μεταξύ των ασθενών με ΣΔ2 με ισχαιμική καρδιοπάθεια (7/142) ή χωρίς ισχαιμική καρδιοπάθεια (8/144) ήταν παρόμοια (OR: 0,88, 95% CI: 0,3-2,5,  $P > 0,1$ ), ενώ στην ομάδα ελέγχου (χωρίς ΣΔ2) ήταν 39/145 στην υποομάδα με ισχαιμική καρδιοπάθεια, έναντι 40/268, στην υποομάδα χωρίς ισχαιμική καρδιοπάθεια (OR: 2,1, 95% CI: 1,28-3,45,  $P = 0,004$ , εικόνα 10). Έτσι, η καταγραφείσα διαφορά στη συχνότητα των υπό μελέτη πολυμορφισμών μεταξύ των ασθενών με ισχαιμική καρδιοπάθεια και χωρίς ισχαιμική καρδιοπάθεια προέκυψε αποκλειστικά από την ομάδα ελέγχου (μη διαβητικοί). Αντίθετα, δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όταν εξετάστηκε η παρουσία μεταλλαγμένων αλληλόμορφων TLR4 υπό το φως της ασταθούς στηθάγχης και του εμφράγματος του μυοκαρδίου, χωριστά ή με το αγγειογραφικά τεκμηριωμένο φορτίο αθηρώματος στις στεφανιαίες αρτηρίες (αριθμός νοσούντων αρτηριών, θέσεις και βαθμός απόφραξης -  $P > 0,1$ , σε όλες τις περιπτώσεις). Παρομοίως, δεν καταγράφηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του TLR4 και των τρόπων θεραπείας (αντιυπερτασικά ή αντιδιαβητικά φάρμακα) ή των επιπέδων γλυκόζης ( $P > 0,1$ ).

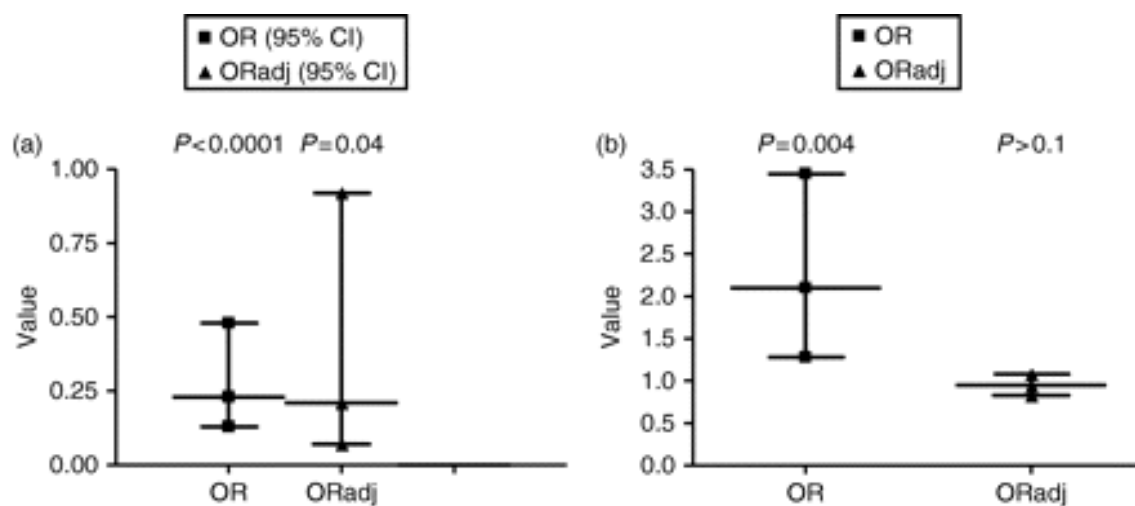


**Εικόνα 9.** Σχετική κατανομή των αλληλομόρφων *TLR4Asp299Gly* και *Thr399Ile* και αθροιστικά σε άτομα με ( $DM = 1$ ) ή χωρίς ( $DM = 0$ ) ΣΔ 2.



**Εικόνα 10.** Συγκριτική κατανομή των μεταλλαγμένων (σκούρο γκρι) και άγριου τύπου (ανοιχτό γκρι) αλληλόμορφων σε διαβητικούς ασθενείς ( $DM = 1$ ) και μη διαβητικούς μάρτυρες ( $DM = 0$ ) με ( $IHD = 1$ ) ή χωρίς ισχαιμική καρδιοπάθεια ( $IHD = 0$ ).

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η αρνητική συσχέτιση των πολυμορφισμών Asp299Gly και Thr399Ile του TLR4 με τον ΣΔ2 παρέμενε στατιστικά σημαντική μετά από προσαρμογή για συγχυτικούς παράγοντες, αν και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μειώθηκε (OR: 0,21, 95% CI: 0,07 έως 0,92, P = 0,04, διορθωμένος  $R^2 = 0,87$ ). Όσον αφορά την αυξημένη παρουσία των γονιδίων που μελετήθηκαν στην ομάδα χωρίς ΣΔ2 με ισχαιμική καρδιοπάθεια, η σημασία αυτού του ευρήματος εξασθένησε πλήρως μετά από προσαρμογή για ηλικία, φύλο, κάπνισμα, οικογενειακό ιστορικό ΙΚΠ, Δείκτη Μάζας Σώματος, υπέρταση, επίπεδα HbA1c, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων καθώς και θεραπεία με στατίνη (OR: 0,94, 95% CI: 0,83-1,08, P > 0,1, διορθωμένος  $R^2 = 0,89$ ). Οι διακυμάνσεις του λόγου των πιθανοτήτων (OR) και των διαστημάτων εμπιστοσύνης 95% (CIs) παρουσιάζονται στην εικόνα 11.



**Εικόνα 11.** Γράφημα του λόγου των πιθανοτήτων (OR) και του διαστήματος εμπιστοσύνης (CI) 95% των πολυμορφισμών Asp299Gly και Thr399Ile για την επαγωγή (α) της σχετιζόμενης με ΣΔ2 ισχαιμικής καρδιοπάθειας και (β) της ανεξάρτητης του ΣΔ2 ισχαιμικής καρδιοπάθειας πριν (OR) και μετά την (ORadj) προσαρμογή για συγχυτικούς παράγοντες.

## Κεφάλαιο 4 Συζήτηση

Η σχετική κατανομή των αλληλόμορφων Asp299Gly και Thr399Ile του TLR4, αξιολογήθηκε σε άτομα με και χωρίς ΣΔ2, και ταυτόχρονα διερευνήθηκε η πιθανή σχέση τους με την εμφάνιση της ισχαιμικής καρδιοπάθειας που σχετίζεται με τον ΣΔ2. Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές [292, 319], τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι οι φορείς αυτών των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων προστατεύονται περισσότερο έναντι του ΣΔ2. Όσο για την επίδραση των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων στην εκδήλωση της ισχαιμικής καρδιοπάθειας, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι σε σύγκριση με τους φορείς των αλληλόμορφων άγριου τύπου, εμφανίζουν παρόμοια συχνότητα ισχαιμικής καρδιοπάθειας που σχετίζεται με ΣΔ2. Για την κατανόηση της σημασίας των παραπάνω ευρημάτων, είναι σημαντικό να συζητηθούν τα ακόλουθα δεδομένα.

Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα Asp299Gly και Thr399Ile του TLR4 προέρχονται από την Αφρική, όπου η ελονοσία αντιπροσωπεύει μια σημαντική πίεση εξέλιξης [320, 321]. Η συχνότητα αυτών των αλληλόμορφων παρουσιάζει μεγάλη γεωγραφική διακύμανση: από 0% στους πληθυσμούς της Πολυνησίας, της Νοτιοανατολικής Ασίας και των αυτόχθονων πληθυσμών της Νότιας Αμερικής έως 5-9% στους Ινδοευρωπαίους [242, 243]. Σε ένα περιβάλλον όπου ενδημεί το *Plasmodium spp.* το Asp299Gly, παρέχει προστασία έναντι της ελονοσίας, ενώ αυξάνει την ευαισθησία σε λοιμώξεις και τον κίνδυνο σηπτικού σοκ [320, 321]. Ωστόσο, η «προσθήκη» του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου Thr399Ile, όπως και στους Ινδοευρωπαίους, μείωσε τον κίνδυνο για σηπτικό σοκ σε ρυθμούς παρόμοιους με αυτούς που παρατηρήθηκαν στους φορείς των αλληλόμορφων άγριου τύπου [320, 321]. Αυτή η ταυτόχρονη παρουσία - αμφότερων των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων ήταν μια χρήσιμη προσθήκη, καθώς η παρουσία του Asp299Gly μόνο θα οδηγούσε σε μεγαλύτερη ευαισθησία κατά τη διάρκεια των επιδημιών της πανώλης, του τυφοειδούς πυρετού και της γρίπης στην Ευρώπη [320, 321]. Αυτές οι δυνάμεις φυσικής επιλογής ενήργησαν έντονα στην περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας, τόπου προέλευσης του υπό μελέτη πληθυσμού, όπου τα ποσοστά ελονοσίας ήταν υψηλά μέχρι τη δεκαετία του 1960, γεγονός που αντανακλάται και στην αυξημένη συχνότητα αιμοσφαιρινοπαθειών στην περιοχή μας σε σύγκριση με άλλες περιοχές στην



Ελλάδα [322, 323]. Έτσι, όπως έχει προηγουμένα δειχθεί και επιβεβαιώνεται στη μελέτη μας, το ποσοστό του πληθυσμού που φέρει τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα είναι υψηλότερο ( $\approx 13,5\%$ ) [324 - 326] σε σύγκριση με άλλους ευρωπαϊκούς - εκτός των Ολλανδών, Ρουμάνων (14%) και Βάσκων (18%) - ή άλλους ελληνικούς πληθυσμούς (6%) [321].

Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα κληρονομούνται είτε συνδεδεμένα είτε ανεξάρτητα και είναι παρόντα σε απογόνους με τη μορφή ενός απλότυπου Asp299Gly/Thr399Ile [327, 328]. Έτσι, δεχόμαστε την ύπαρξη έξι διαφορετικών απλοτύπων: άγριου τύπου/άγριου τύπου, άγριου τύπου/Asp299Gly, άγριου τύπου/Thr399Ile, Asp299Gly/Thr399Ile, Asp299Gly/Asp299Gly, Thr399Ile/Thr399Ile.

Η διπλή μετάλλαξη Asp299Gly/Thr399Ile [320, 321], έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλει τη δομή του υποδοχέα TLR4, οδηγώντας σε μια προβληματική σύνδεση των προσδετών του [329]. Αυτή η δομική και λειτουργική ανωμαλία φαίνεται τελικά να είναι υπεύθυνη για μια πιο αμβλεία ανοσοαπόκριση, δηλαδή μία μειωμένη παραγωγή IgA έναντι μικροβιακών στόχων, όπως το *Helicobacter pylori* [325], μειωμένη αναγνώριση των σημάτων απόπτωσης κατά τη διάρκεια της αντικαρκινικής θεραπείας [330] ή την παρουσία μειωμένων επιπέδων λειτουργικών υποδοχέων TLR4 [331]. Εντούτοις, η ενεργοποίηση του λειτουργικού TLR4 σε ιστούς-στόχους της ινσουλίνης, από λιπαρά οξέα - διαιτητικά ή ενδογενή - έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί φλεγμονώδεις αποκρίσεις, δηλ. υπερβολική παραγωγή κυτταροκινών, ενεργών ριζών οξυγόνου, εικοσανοειδών και ενεργοποίηση κινασών, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν σε απευαισθητοποίηση έναντι της ινσουλίνης [290]. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα χαρακτηριστικά μαζί με τα στοιχεία που συνδέουν αυτή την αυξημένη λειτουργικότητα TLR4 με εμμένουσα φλεγμονή και την εμφάνιση ΣΔ2 [311, 312], είναι λογικό να υποθέσουμε ότι εκείνοι που φέρουν έναν πολυμορφισμό TLR4, που καταστέλλει τη λειτουργικότητα του, και συνεπώς τα αντίστοιχα φαινόμενα, είναι τελικά περισσότερο προστατευμένοι έναντι της συγκεκριμένης ασθένειας.

Παρόλο που θα ήταν αναμενόμενο ένα παρόμοιο προστατευτικό αποτέλεσμα έναντι της ισχαιμικής καρδιοπάθειας, επειδή ένας

μεταλλαγμένος και με μειωμένη λειτουργικότητα TLR4 θα μπορούσε επίσης να καταστείλει τις φλεγμονώδεις διεργασίες που εμπλέκονται στην αθηρογένεση και την αποσταθεροποίηση της πλάκας, αυτό δεν επιβεβαιώθηκε στη μελέτη μας. Αυτή η έλλειψη προστασίας, που επίσης καταγράφεται σε άλλες μελέτες, φαίνεται να επιβεβαιώνει την άποψη ότι η τροποποιημένη λειτουργικότητα του TLR4 είναι ένα «δίκτοπο σπαθί» [218, 294, 315]. Επομένως, είναι πιθανό τα οφέλη από μια λιγότερο έντονη φλεγμονώδη απόκριση εντός του αγγειακού τοιχώματος να μπορούν να αντισταθμιστούν, για παράδειγμα, από μια αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις από ένα μεγαλύτερο φορτίο παθογόνων, το οποίο έχει συσχετιστεί με την ισχαιμική καρδιοπάθεια [294, 316, 317]. Επιπρόσθετα, κάθε ευεργετική επίδραση που προκαλείται από τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα TLR4 μπορεί να εξασθενεί από την παρουσία των κλασικών παραγόντων κινδύνου για ισχαιμική καρδιοπάθεια (κάπνισμα, υπέρταση, ΣΔ2, δυσλιπιδαιμία, κλπ.). Τα ευρήματά μας δεν υποστηρίζουν έναν πρόσθετο ρόλο για τους πολυμορφισμούς *TLR4 Asp299Gly* και *Thr399Ile* σε σχέση με την ισχαιμική καρδιοπάθεια που σχετίζεται με τον ΣΔ2, επειδή δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά στην ευαισθησία έναντι της ισχαιμικής καρδιοπάθειας σε ασθενείς με ΣΔ2, που φέρουν τα μεταλλαγμένα ή τα αλληλόμορφα άγριου τύπου. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των ευρημάτων μας απαιτούνται μεγαλύτερες μελέτες, κατά προτίμηση σε πληθυσμούς όπου αυτές οι μεταλλάξεις είναι αρκετά συχνές, όπως πχ. οι Βάσκοι [321], πριν η υπόθεση να απορριφθεί οριστικά.

Όταν εξετάζουμε τα προαναφερθέντα δεδομένα σχετικά με το προστατευτικό δυναμικό των μεταλλάξεων TLR4, αναδεικνύεται ένα προφανές παράδοξο. Παρά τη σχετικά υψηλή συχνότητα των προστατευτικών αλληλόμορφων TLR4 στους δυτικούς πληθυσμούς, παρατηρείται μια αυξανόμενη επίπτωση ΣΔ2 [306, 307]. Το φαινόμενο προφανώς οφείλεται στην επίδραση του τρόπου ζωής και των περιβαλλοντικών παραγόντων (πλούσια σε λιπαρά και θερμίδες δίαιτα, με χαμηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά, χαμηλά επίπεδα άσκησης, κλπ.) στην ανάπτυξη του ΣΔ2 [306, 307, 308] σε άλλους γενετικούς παράγοντες [309, 332, 333] και στο ότι το σημερινό «σταθερό» μεταλλαγμένο γενετικό υπόβαθρο του TLR4 επηρεάστηκε κυρίως από την ουδέτερη γενετική μετατόπιση [320, 321],

επειδή οι παραδοσιακές εκλεκτικές πιέσεις (λοιμώξεις) έχουν υποχωρήσει ως αποτέλεσμα επιθετικών αντιμικροβιακών πρακτικών, δηλαδή απολύμανση του νερού, χρήση αντιβιοτικών, και τα λοιπά.

## Κεφάλαιο 5 Συμπεράσματα και Κλινικές Προοπτικές

Καταγράφηκαν οι φορείς κοινών πολυμορφισμών Asp299Gly και Thr399Ile του υποδοχέα TLR4 σε διαβητικούς και μη διαβητικούς ασθενείς, με και χωρίς ισχαιμική καρδιοπάθεια για να αξιολογηθεί ο πιθανός προστατευτικός τους ρόλος έναντι της σχετιζόμενης με το διαβήτη ισχαιμικής καρδιοπάθειας σε γηγενή πληθυσμό της Κεντρικής Ελλάδας. Τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι φορείς των πολυμορφισμών αυτών είναι πιο προστατευμένοι έναντι της εμφάνισης του ΣΔ2, όχι όμως και έναντι της εμφάνισης ισχαιμικής καρδιοπάθειας που σχετίζεται με ΣΔ2, συγκριτικά με φυσιολογικούς μάρτυρες φορείς αλληλομόρφων άγριου τύπου.

### Προγνωστικές προοπτικές

Οι κλασικές μελέτες σύνδεσης παθογένειας με παραλλαγές γονιδιωμάτων, σχεδιάστηκαν να εντοπίζουν πολυμορφισμούς κλινικής σημασίας υψηλής συχνότητας (>1%) και μέτριας συνεπώς βαρύτητας. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγεί η διαπίστωση ότι οι υψηλές συχνότητες πολυμορφισμών παραπέμπουν σε μακρινό χρονικό ορίζοντα αρχικής τους εγκατάστασης, της τάξης των χιλιάδων ετών στο παρελθόν, με την αυξητική τους επικράτηση να προϋποθέτει παράλληλη εμφάνιση πολυμορφισμών εξισορρόπησης του αρχικού αρνητικού τους δυναμικού μετριάζοντας προοπτικά τη βαρύτητα και η γενικότερη κλινική τους αξία. Μεγάλης βαρύτητας πολυμορφισμοί παθογένειας αναμένεται να έχουν χαμηλή συχνότητα (<0.1%) λόγω αρνητικής επιλογής ή και πρόσφατης εγκατάστασης στο πληθυσμό, η μελέτη των οποίων απαιτεί ανάλυση τετραψήφιου τουλάχιστον αριθμού περιστατικών για την εξαγωγή στατιστικά αξιόπιστων κλινικών συσχετισμών.

Η παρούσα μελέτη εστίασε σε πληθυσμό της Κεντρικής Ελλάδας που μέχρι πρόσφατα ενδημούσε η ελονοσία. Όπως είναι γνωστό, το στίγμα που εμφανίζει ιδιότυπη αύξηση συχνότητας σε περιβάλλον ελονοσίας φέρει μεταλλαγές μεγάλης βαρύτητας. Αντίστοιχα και οι

μεταλλαγές TLR4 που δρουν υποβοηθητικά ενισχύοντας την επικράτησή του συμμετέχοντας παράλληλα σε υπερτασικές διαταραχές όπως η πρῶιμη προεκλαμψία, θα είναι μεγάλης βαρύτητας και υψηλής συχνότητας ώστε σχετικά μικρές ομάδες ασθενών να επαρκούν για την αξιόπιστη στατιστικά ταυτοποίηση τους. Η ταυτοποίηση τέτοιων πολυμορφισμών μεγάλης κλινικής βαρύτητας και υψηλής συχνότητας, θα ήταν εν δυνάμει αξιοποιήσιμη στη διάγνωση, ταξινόμηση, συμβουλευτική και διαχείριση του κινδύνου ισχαιμικής καρδιοπάθειας.

Ανεξάρτητα πάντως από τη μέθοδο εντοπισμού και τα κριτήρια επιλογής πολυμορφισμών μεγάλης κλινικής βαρύτητας και υψηλής συχνότητας και με δεδομένη τη συμμετοχή πολλών γονιδιακών συστημάτων στη διαμόρφωση σύνθετων παθολογικών φαινοτύπων, θα απαιτηθεί συστηματική καταγραφή πολυγονιδιακής βαθμολογίας (polygenic scores) για την ανάδειξη αντιπροσωπευτικού μίγματος διαγνωστικών βιοδεικτών ισχαιμικής καρδιοπάθειας παγκόσμιας εμβέλειας [334].

## **Η κλινική σημασία της αναστολής του TLR4**

Οι TLR είναι αναμφισβήτητα κεντρικά μόρια στην αθηρογένεση. Η κατανόηση της σχέσης τους με τη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Οι στατίνες αναστέλλουν την έκφραση και ενεργοποίηση του TLR4 στα περιφερικά μονοκύτταρα. Επίσης, συνθετικοί ανταγωνιστές των TLR βρίσκονται υπό μελέτη. Ωστόσο, η ανάπτυξη τους απαιτεί πολύχρονη έρευνα, αφού οι TLR εκφράζονται σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και είναι απαραίτητοι για την αποτελεσματική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος στα παθογόνα.

Επί του παρόντος, το κεντρικό ερώτημα κατά πόσον είναι δυνατόν να μετριαστεί η επιβλαβής μυοκαρδιακή φλεγμονή και να διατηρηθούν ταυτόχρονα τα πλεονεκτήματα της έμφυτης/εγγενούς ανοσίας κατά την προσπάθεια εξωγενούς ρύθμισης της TLR4 σηματοδότησης, παραμένει αναπάντητο. Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για την αρνητική ρύθμιση του TLR4 ώστε

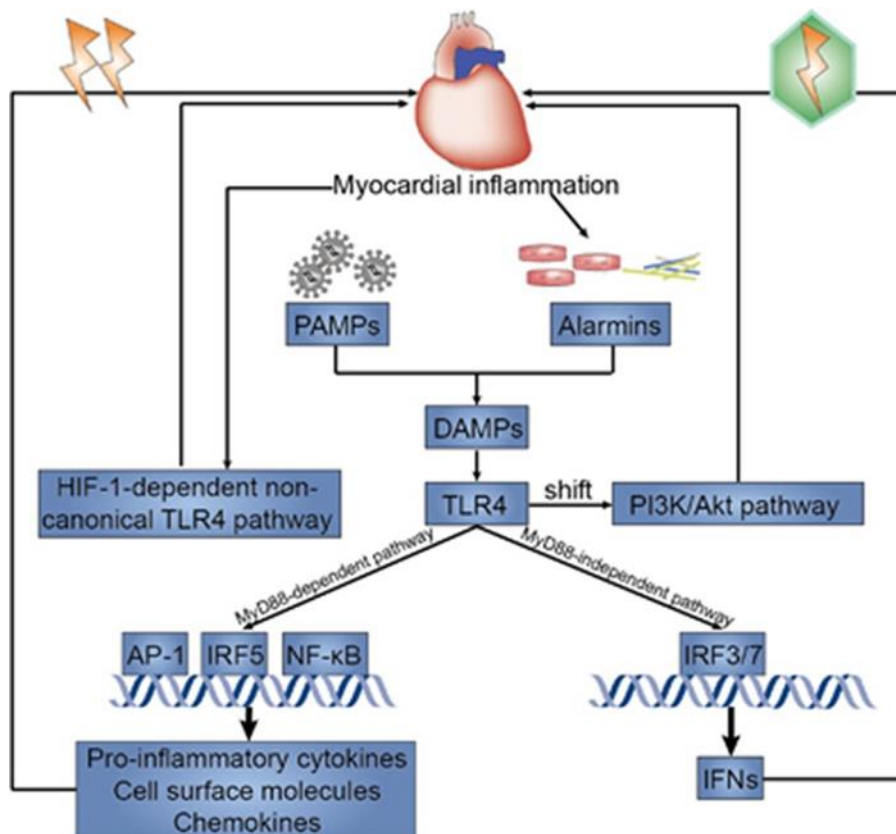
να αντισταθμιστούν οι συνέπειες της ενεργοποίησης του, που οδηγούν σε καταστροφική μυοκαρδιακή φλεγμονή. Για παράδειγμα, η διερεύνηση της κλινικής σημασίας της καταστολής του ανοσοποιητικού μπορεί να συμβάλει στην εξασθένιση της TLR4-μεσολαβούμενης μυοκαρδιακής φλεγμονής. Επιπλέον, περαιτέρω έρευνα αναμένεται να διευκολύνει την ανάπτυξη νέων θεραπειών που απευθύνονται στα στοιχεία της έμφυτης ανοσίας στη μυοκαρδιακή φλεγμονή. Μια σειρά από ανταγωνιστές και αναστολείς του TLR4 έχουν αναπτυχθεί και μερικοί από αυτούς έχουν ήδη ερευνηθεί σε καρδιές ζώων.

Ένας από τους ανταγωνιστές του TLR4, η εριτοράνη, σε ένα in-vivo μοντέλο ποντικού με καρδιακή υπερτροφία, οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1 $\beta$  και IL-6 και αυξημένη παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL - 10 [335]. Επιπλέον, ο RP105, ένας ομόλογος TLR4 που στερείται τον TIR τομέα και αναστέλλει ανταγωνιστικά την TLR4 σηματοδότηση, φαίνεται υποσχόμενη θεραπεία στην καρδιακή δυσλειτουργία μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου, παρεμποδίζοντας τον ρόλο των TLR4 σηματοδοτικών μονοπατιών στην μυοκαρδιακή αναδιαμόρφωση και δρώντας καρδιοπροστατευτικά [336]. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει ξεκινήσει η χρήση TLR4 αναστολέων ή ανταγωνιστών σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους, με στόχο την πρόληψη ή θεραπεία των καρδιακών νόσων.

Από την άλλη πλευρά, στόχευση σε επόμενα στάδια και μόρια στην πορεία του TLR4 σηματοδοτικού μονοπατιού είναι επίσης εφικτή. Μια ποικιλία ενδογενών ανασταλτικών παραγόντων που ρυθμίζουν αρνητικά τα TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν εντοπισθεί. Ωστόσο, άμεση αναστολή του TLR4 μπορεί να μην αποτελεί θεραπευτική επιλογή για τη βελτίωση της πρόγνωσης της μυοκαρδιακής φλεγμονής, αφού η TLR4 αναστολή μπορεί να οδηγήσει σε λειτουργική απώλεια του μηχανισμού έμφυτης/εγγενούς ανοσίας. Ο TLR4 μπορεί επίσης να διαδραματίζει επωφελή ρόλο στην φλεγμονή του μυοκαρδίου, ειδικά στη μυοκαρδίτιδα. Ο TLR4 ενεργοποιεί το MyD88-ανεξάρτητο μονοπάτι και προωθεί περαιτέρω την έκφραση της IFN- $\beta$ , ασκώντας μια αντι-ιική επίδραση. Έτσι, αν και η παραγωγή υπερβολικών προφλεγμονωδών κυτταροκινών ασκεί επιζήμιες επιδράσεις στη μυοκαρδιακή

φλεγμονή, ορισμένες κυτταροκίνες ενισχύουν την άμυνα του ξενιστή και την ιστική επισκευή μέσα στην καρδιά.

Επιπλέον, ορισμένα άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια μπορεί να αλληλεπιδρούν με τα TLR4 μονοπάτια και να ασκούν ρυθμιστικές επιδράσεις στη μυοκαρδιακή φλεγμονή. Το PI3K/Akt σηματοδοτικό μονοπάτι μπορεί να χρησιμεύσει ως ένας ενδογενής ρυθμιστής αρνητικής ανάδρασης της TLR4 σηματοδότησης στη μυοκαρδιακή φλεγμονή και να συμβάλει στην λιγότερο δυσπροσαρμοστική αναδιαμόρφωση σε TLR4-ανεπαρκή ποντίκια. Μια μετατόπιση από το κυρίαρχο TLR4-NF-κB σηματοδοτικό μονοπάτι προς το PI3K/Akt σηματοδοτικό μονοπάτι μπορεί να ασκεί προστατευτικό ρόλο στην φλεγμονή του μυοκαρδίου. Εκτός από τα κλασικά TLR4 σηματοδοτικά μονοπάτια, πιθανώς υπάρχει ένα νέο HIF-1-εξαρτώμενο μη κανονικό TLR4 σηματοδοτικό μονοπάτι κατά τη διαδικασία της μυοκαρδιακής φλεγμονής, όπως αποδεικνύεται από την αύξηση της έκφρασης μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με τη δραστηριότητα του NF-κB, όπως ο HIF-1α και από τη μείωση στην έκφραση γονιδίων που επάγονται από τον TLR4, όπως ο TNF-α (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12.** Η ενεργοποίηση του TLR4 και η συμμετοχή των κλασικών και εναλλακτικών σηματοδοτικών μονοπατιών στη μυοκαρδιακή φλεγμονή.

Παρά τη σημαντική πρόοδο, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά ανεπίλυτα ζητήματα που είναι κρίσιμα για την εις βάθος κατανόηση των ρόλων των TLR4 σηματοδοτικών μονοπατιών, πριν τη μετάβαση στην κλινική εφαρμογή. Για παράδειγμα, ποιος είναι ο ακριβής ρόλος του TLR4 στην παθογένεση των καρδιακών παθήσεων, προ-φλεγμονώδης ή αντιφλεγμονώδης; Βλαπτικός ή προστατευτικός; Πώς επηρεάζει η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος τον TLR4; Ποιοι είναι οι ειδικοί αναστολείς TLR4 στη μυοκαρδιακή φλεγμονή; Ποια στοιχεία έμφυτης/εγγενούς ανοσίας μπορεί να αποτελέσουν θεραπευτικό στόχο; Αυτά τα ερωτήματα θα πρέπει να απαντηθούν πριν ο TLR4 θεωρηθεί θεραπευτικός στόχος στη μυοκαρδιακή φλεγμονή.



## Βιβλιογραφία

1. Clark H. NCDs: a challenge to sustainable human development. *Lancet* 2013;381(9866): 510–511. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60058-6.
2. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, Ahmed M, Aksut B, Alam T, Alam K, et al. Global, regional, and National Burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(1):1–25. doi:10.1016/j.jacc.2017.04.052.
3. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):e442. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442.
4. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, Casey DC, Charlson FJ, Chen AZ, Coates MM, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459–1544. doi:10.1016/S0140-6736(16) 31012-1.
5. Kassebaum NJ, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown J, Carter A, Casey DC, Charlson FJ, Coates MM, Coggeshall M, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1603–1658. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31460-X.
6. Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown A, Carter A, Casey DC, Charlson FJ, Chen AZ, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1545–1602. doi:10.1016/S0140-6736(16)31678-6.
7. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Anderson HR, Bhutta ZA, Biryukov S, Brauer M, Burnett R, Cercy K, Charlson FJ, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioral, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1659–1724. doi: 0.1016/S0140-6736(16)31679-8.
8. Grad C, Zdrengea D. Heart rate recovery in patients with ischemic heart disease risk factors. *Clujul Med*. 2014;87(4):220–225. doi:10.15386/cjmed-385.

9. Aalami Harandi S, Sarrafzadegan N, Sadeghi M, Talaei M, Dianatkhah M, Oveisgharan S, Pourmoghaddas A, Salehi A, Sedighifard Z. Do Cardiometabolic risk factors relative risks differ for the occurrence of ischemic heart disease and stroke? *Res Cardiovasc Med*. 2016; 10:5812/cardiovasmed.30619.
10. Cooper R, Cutler J, Desvigne-Nickens P, Fortmann SP, Friedman L, Havlik R, Hogelin G, Marler J, McGovern P, Morosco G, et al. Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the United States: findings of the national conference on cardiovascular disease prevention. *Circulation*. 2000;102(25):3137–3147. doi: 10.1161/01.CIR.102.25.3137.
11. World Health Organization. World Heart Federation. World Stroke Organization. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control: policies, strategies and interventions. 2011.
12. Nowbar AN, Howard JP, Finegold JA, Asaria P, Francis DP. 2014 global geographic analysis of mortality from ischemic heart disease by country, age and income: Statistics from World Health Organization and United Nations. *Int J Cardiol*. 2014;174(2):293–298. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.096.
13. Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, Moran AE. Global overview of the epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease. *Arch Med Res*. 2015;46(5):328–338. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.06.006.
14. Gaziano TA, Bitton A, Anand S, Abrahams-Gessel S, Murphy A. Growing epidemic of coronary heart disease in low- and middle-income countries. *Curr Probl Cardiol*. 2010;35(2):72–115. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2009.10.002.
15. Steenbergen C, Frangogiannis NG, *Ischemic Heart Disease in Muscle, Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00036-316>.
16. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1262–1275.
17. Wentzel JJ, Chatzizisis YS, Gijzen FJ, Giannoglou GD, Feldman CL, Stone PH. Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions. *Cardiovasc Res*. 2012;96:234–243.

18. Millonig G, Niederegger H, Rabl W, Hochleitner BW, Hofer D, Romani N, Wick G. Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:503–508.
19. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1992;85:391–405.
20. Schwartz SM, de Blois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res.* 1995;77:445–465.
21. Velican D, Velican C. Atherosclerotic involvement of the coronary arteries of adolescents and young adults. *Atherosclerosis.* 1980;36:449–460.
22. Cheng C, Tempel D, van Haperen R, van der Baan A, Grosveld F, Daemen MJ, Krams R, de Crom R. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation.* 2006;113:2744–2753.
23. Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2311–2316.
24. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473:317–325.
25. Subramanian M, Tabas I. Dendritic cells in atherosclerosis. *Semin Immunopathol.* 2014;36:93–102.
26. Skoln K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultin LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borin J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002;417:750–754.
27. Tabas I, Williams KJ, Borin J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007;116:1832–1844.
28. Leitinger N, Schulman IG. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:1120–1126.
29. Hansson GK, Jonasson L. The discovery of cellular immunity in the atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1714–1717.
30. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res.* 2009;50(suppl):S376–S381.

31. Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am J Pathol.* 1992;140:907–914.
32. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1997;100:2680–2690.
33. Stary HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:1297S–1306S.
34. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:840–856.
35. Strong, J.P., Malcom, G.T., McMahan, C.A., Tracy, R.E., Newman, W.P. 3rd, Herderick, E.E., and Cornhill, J.F. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *JAMA.* 1999; 281: 727–735.
36. Kolodgie FD, Burke AP, Nakazawa G, Virmani R. Is pathologic intimal thickening the key to understanding early plaque progression in human atherosclerotic disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:986–989.
37. Dalager S, Paaske WP, Kristensen IB, Laurberg JM, Falk E. Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke.* 2007;38:2698–2705.
38. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011;145:341–355.
39. Clarke MC, Bennett MR. Cause or consequence: what does macrophage apoptosis do in atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:153–155.
40. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:36–46. 54.
41. Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1256–1261.

42. McGill HC Jr, McMahan CA, Malcom GT, Oalman MC, Strong JP. Effects of serum lipoproteins and smoking on atherosclerosis in young men and women. The PDAY Research Group. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:95–106.
43. Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol.* 1995;26:450–456.
44. Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens AP, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, Duimel H, Frederik PM, van Hinsbergh VW, Virmani R, Daemen MJ. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:1517–1527.
45. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med.* 1984;310:1137–1140.
46. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med.* 2003;349:2316–2325.
47. Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J.* 1983;50:127–134.
48. Purushothaman M, Krishnan P, Purushothaman KR, Baber U, Tarricone A, Perez JS, Wiley J, Kini A, Sharma SK, Fuster V, Moreno PR. Genotype dependent impairment of hemoglobin clearance increases oxidative and inflammatory response in human diabetic atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2769–2775.
49. Cahill LE, Levy AP, Chiuve SE, Jensen MK, Wang H, Shara NM, Blum S, Howard BV, Pai JK, Mukamal KJ, Rexrode KM, Rimm EB. Haptoglobin genotype is a consistent marker of coronary heart disease risk among individuals with elevated glycosylated hemoglobin. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:728–737.
50. Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC. Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. *Circulation.* 1989;80:1747–1756.
51. Stary HC. *An Atlas of Atherosclerosis: Progression and Regression.* New York: Parthenon Publishing Group; 1999.

52. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355–1374.
53. Gomez D, Shankman LS, Nguyen AT, Owens GK. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods*. 2013;10:171–177.
54. Bentzon JF, Weile C, Sondergaard CS, Hindkjaer J, Kassem M, Falk E. Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2696–2702.
55. Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, Helms JA, Li S. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nat Commun*. 2012;3:875.
56. Bentzon JF, Falk E. Circulating smooth muscle progenitor cells in atherosclerosis and plaque rupture: current perspective and methods of analysis. *Vascul Pharmacol*. 2010;52:11–20.
57. Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, Joner M, Virmani R. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:724–736.
58. Stary HC. The development of calcium deposits in atherosclerotic lesions and their persistence after lipid regression. *Am J Cardiol*. 2001;88:16E–19E.
59. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987;316:1371–1375.
60. Nishioka T, Luo H, Eigler NL, Berglund H, Kim CJ, Siegel RJ. Contribution of inadequate compensatory enlargement to development of human coronary artery stenosis: an in vivo intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:1571–1576.
61. Varnava AM, Mills PG, Davies MJ. Relationship between coronary artery remodeling and plaque vulnerability. *Circulation*. 2002;105:939–943.
62. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber D, Virmani R. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:297–303.

63. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. 2000;83:361–366.
64. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657–671.
65. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J*. 2013;34:719–728.
66. Kubo T, Imanishi T, Takarada S, Kuroi A, Ueno S, Yamano T, Tanimoto T, Matsuo Y, Masho T, Kitabata H, Tsuda K, Tomobuchi Y, Akasaka T. Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction: ability of optical coherence tomography compared with intravascular ultrasound and coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:933–939.
67. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y, Smialek J, Virmani R. Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation*. 1998;97:2110–2116.
68. Jia H, Abtahian F, Aguirre AD, et al. In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:1748–1758.
69. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med*. 1997;336:1276–1282.
70. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Gold HK, Yuan J, Narula J, Finn AV, Virmani R. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol*. 2001;16:285–292.
71. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36–44.
72. Mittleman MA, Mostofsky E. Physical, psychological and chemical triggers of acute cardiovascular events: preventive strategies. *Circulation*. 2011;124:346–354.
73. Muller JE, Stone PH, Turi ZG, Rutherford JD, Czeisler CA, Parker C, Poole WK, Passamani E, Roberts R, Robertson T. Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1985;313:1315–1322.

74. Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, Grove EL, Choudry FA. The causal role of megakaryocyte–platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9:658–670.
75. Kloner RA, Leor J, Poole WK, Perritt R. Population-based analysis of the effect of the Northridge Earthquake on cardiac death in Los Angeles County, California. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1174–1180.
76. Kramer MC, Rittersma SZ, de Winter RJ, Ladich ER, Fowler DR, Liang YH, Kutys R, Carter-Monroe N, Kolodgie FD, van der Wal AC, Virmani R. Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:122–132.
77. Hao H, Gabbiani G, Camenzind E, Bacchetta M, Virmani R, Bochaton - Piallat ML. Phenotypic modulation of intima and media smooth muscle cells in fatal cases of coronary artery lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:326–332.
78. Davies MJ, Bland JM, Hangartner JR, Angelini A, Thomas AC. Factors influencing the presence or absence of acute coronary artery thrombi in sudden ischaemic death. *Eur Heart J*. 1989;10:203–208.
79. Mann J, Davies MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. *Heart*. 1999;82:265–268.
80. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, Virmani R. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation*. 2001;103:934–940.
81. Barua RS, Ambrose JA. Mechanisms of coronary thrombosis in cigarette smoke exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1460–1467.
82. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23:1562–1569.
83. Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res*. 2011;109:593–606.
84. Falk E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation*. 1985;71:699–708.
85. Rittersma SZ, van der Wal AC, Koch KT, Piek JJ, Henriques JP, Mulder KJ, Ploegmakers JP, Meesterman M, de Winter RJ. Plaque instability



frequently occurs days or weeks before occlusive coronary thrombosis: a pathological thrombectomy study in primary percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 2005;111:1160–1165.

86. Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, Kadell AM, Wroblewski SK, Burdick MD, Schmidt R, Kunkel SL, Greenfield LJ. Venous thrombosis associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:258–268.

87. Falk E, Thuesen L. Pathology of coronary microembolisation and no reflow. *Heart*. 2003;89:983–985.

88. Schwartz RS, Burke A, Farb A, Kaye D, Lesser JR, Henry TD, Virmani R. Microemboli and microvascular obstruction in acute coronary thrombosis and sudden coronary death: relation to epicardial plaque histopathology. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2167–2173.

89. Yee KO, Schwartz SM. Why atherosclerotic vessels narrow: the fibrin hypothesis. *Thromb Haemost*. 1999;82:762–771.

90. Brusckhe AV, Kramer JR Jr, Bal ET, Haque IU, Detrano RC, Goormastic M. The dynamics of progression of coronary atherosclerosis studied in 168 medically treated patients who underwent coronary arteriography three times. *Am Heart J*. 1989;117:296–305.

91. Dalager S, Falk E, Kristensen IB, Paaske WP. Plaque in superficial femoral arteries indicates generalized atherosclerosis and vulnerability to coronary death: an autopsy study. *J Vasc Surg*. 2008;47:296–302.

92. Otsuka F, Fuster V, Narula J, Virmani R. Omnipresent atherosclerotic disease: time to depart from analysis of individual vascular beds. *Mt Sinai J Med*. 2012;79:641–653.

93. Sillesen H, Muntendam P, Adourian A, Entekin R, Garcia M, Falk E, Fuster V. Carotid plaque burden as a measure of subclinical atherosclerosis: comparison with other tests for subclinical arterial disease in the High Risk Plaque BioImage study. *J Am Coll Cardiol Cardiovasc Imaging*. 2012;5:681–689.

94. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106:3143–3421.

95. Nicholls SJ, Ballantyne CM, Barter PJ, Chapman MJ, Erbel RM, Libby P, Raichlen JS, Uno K, Borgman M, Wolski K, Nissen SE. Effect of two

intensive statin regimens on progression of coronary disease. *N Engl J Med*. 2011;365:2078–2087.

96. Kini AS, Baber U, Kovacic JC, Limaye A, Ali ZA, Sweeny J, Maehara A, Mehran R, Dangas G, Mintz GS, Fuster V, Narula J, Sharma SK, Moreno PR. Changes in plaque lipid content after short-term intensive versus standard statin therapy: the YELLOW trial (reduction in yellow plaque by aggressive lipid-lowering therapy). *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:21–29.

97. Bjorkegren JL, Hagg S, Talukdar HA, Foroughi Asl H, Jain RK, Cedergren C, Shang MM, Rossignoli A, Takolander R, Melander O, Hamsten A, Michoel T, Skogsberg J. Plasma cholesterol-induced lesion networks activated before regression of early, mature, and advanced atherosclerosis. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004201.

98. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:C7–C12.

99. Schaar JA, Muller JE, Falk E, Virmani R, Fuster V, Serruys PW, Colombo A, Stefanadis C, Ward Casscells S, Moreno PR, Maseri A, van der Steen AF. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece. *Eur Heart J*. 2004;25:1077–1082.

100. Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. 2003;108:1664–1672.

101. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, de Bruyne B, Cristea E, Mintz GS, Mehran R, McPherson J, Farhat N, Marso SP, Parise H, Templin B, White R, Zhang Z, Serruys PW; PROSPECT Investigators. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;364:226–235.

102. Fishbein MC, Siegel RJ. How big are coronary atherosclerotic plaques that rupture? *Circulation*. 1996;94:2662–2666.

103. Bezerra HG, Higuchi ML, Gutierrez PS, Palomino SA, Silvestre JM, Libby P, Ramires JA. Atheromas that cause fatal thrombosis are usually large and frequently accompanied by vessel enlargement. *Cardiovasc Pathol*. 2001;10:189–196.

104. Puri R, Nicholls SJ, Ellis SG, Tuzcu EM, Kapadia SR. High-risk coronary atheroma—the interplay between ischemia, plaque burden and disease progression. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1134–1140.

105. Narula J, Nakano M, Virmani R, Kolodgie FD, Petersen R, Newcomb R, Malik S, Fuster V, Finn AV. Histopathologic characteristics of atherosclerotic coronary disease and implications of the findings for the invasive and

noninvasive detection of vulnerable plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:1041–1051.

106. Niccoli G, Stefanini GG, Capodanno D, Crea F, Ambrose JA, Berg R. Are the culprit lesions severely stenotic? *J Am Coll Cardiol Cardiovasc Imaging*. 2013;6:1108–1114.

107. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:2054–2061.

108. Kohchi K, Takebayashi S, Hiroki T, Nobuyoshi M. Significance of adventitial inflammation of the coronary artery in patients with unstable angina: results at autopsy. *Circulation*. 1985; 71:709–716.

109. Otsuka F, Finn AV, Virmani R. Do vulnerable and ruptured plaques hide in heavily calcified arteries? *Atherosclerosis*. 2013; 229:34–37.

110. Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, Nakamura Y, Yamashita H, Yamagishi H, Takeuchi K, Naruko T, Haze K, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2004; 110:3424–3429.

111. Rachel Hajar, Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives, *Heart Views*, 2017;18(3): 109-114

112. Mack M, Gopal A. Epidemiology, traditional and novel risk factors in coronary artery disease. *Heart Fail Clin*. 2016 Jan. 12 (1):1-10.

113. Cohen R, Budoff M, McClelland RL, et al. Significance of a positive family history for coronary heart disease in patients with a zero coronary artery calcium score (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *Am J Cardiol*. 2014 Oct 15. 114(8):1210-4.

114. Meadows TA, Bhatt DL, Cannon CP, et al. Ethnic differences in cardiovascular risks and mortality in atherothrombotic disease: insights from the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) registry. *Mayo Clin Proc*. 2011 Oct. 86(10):960-7.

115. Virani SS, Brautbar A, Davis BC, et al. Associations between lipoprotein(a) levels and cardiovascular outcomes in black and white subjects: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2012 Jan 17. 125(2):241-9.

116. Huxley RR, Barzi F, Lam TH, et al. Isolated low levels of high-density lipoprotein cholesterol are associated with an increased risk of coronary heart disease: an individual participant data meta-analysis of 23 studies in

the Asia-Pacific region. *Circulation*. 2011 Nov 8. 124(19):2056-64. [Medline].

117. Odegaard AO, Koh WP, Gross MD, Yuan JM, Pereira MA. Combined lifestyle factors and cardiovascular disease mortality in Chinese men and women: the Singapore Chinese health study. *Circulation*. 2011 Dec 20. 124(25):2847-54.

118. LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 7. 352(14):1425-35.

119. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003 May 21. 289(19):2560-72.

120. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, et al. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2001 Nov 1. 345(18):1291-7.

121. Allen N, Berry JD, Ning H, et al. Impact of blood pressure and blood pressure change during middle age on the remaining lifetime risk for cardiovascular disease: the cardiovascular lifetime risk pooling project. *Circulation*. 2012 Jan 3. 125(1):37-44.

122. Nordmann AJ, Suter-Zimmermann K, Bucher HC, et al. Meta-analysis comparing mediterranean to low-fat diets for modification of cardiovascular risk factors. *Am J Med*. 2011 Sep. 124(9):841-851.e2.

123. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990 May 31. 322(22):1561-6.

124. Rea TD, Heckbert SR, Kaplan RC, et al. Smoking status and risk for recurrent coronary events after myocardial infarction. *Ann Intern Med*. Sep 17 2002. 137(6):494-500.

125. Huxley RR, Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Lancet*. 2011 Oct 8. 378(9799):1297-305.

126. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979;241:2035-8. [PubMed: 430798]

127. Paynter NP, Mazer NA, Pradhan AD, Gaziano JM, Ridker PM, Cook NR. Cardiovascular risk prediction in diabetic men and women using

hemoglobin A1c vs diabetes as a high-risk equivalent. *Arch Intern Med*. 2011 Oct 24. 171(19):1712-8.

128. Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, et al. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA*. Dec 2 1998. 280(21):1843-8.

129. Bacha F, Edmundowicz D, Sutton-Tyrell K, Lee S, Tfayli H, Arslanian SA. Coronary artery calcification in obese youth: what are the phenotypic and metabolic determinants? *Diabetes Care*. 2014 Sep. 37(9):2632-9.

130. Das SR, Alexander KP, Chen AY, et al. Impact of body weight and extreme obesity on the presentation, treatment, and in-hospital outcomes of 50,149 patients with ST-Segment elevation myocardial infarction results from the NCDR (National Cardiovascular Data Registry). *J Am Coll Cardiol*. 2011 Dec 13. 58(25):2642-50.

131. Sharma S, Batsis JA, Coutinho T, et al. Normal-weight central obesity and mortality risk in older adults with coronary artery disease. *Mayo Clin Proc*. 2016 Mar. 91 (3):343-51.

132. Thompson PD, Buchner D, Pina IL, et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention). *Circulation*. Jun 24 2003. 107(24):3109-16.

133. Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, et al. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *N Engl J Med*. Sep 5 2002. 347(10):716-25.

134. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Dec 14. 56(25):2182-99.

135. Chiuve SE, Fung TT, Rexrode KM, et al. Adherence to a low-risk, healthy lifestyle and risk of sudden cardiac death among women. *JAMA*. 2011 Jul 6. 306(1):62-9.

136. Shah RV, Murthy VL, Colangelo LA, et al. Association of fitness in young adulthood with survival and cardiovascular risk: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *JAMA Intern Med*. 2016 Jan. 176 (1):87-95.

137. Stamatakis E, Hamer M, Dunstan DW. Screen-based entertainment time, all-cause mortality, and cardiovascular events: Population-based study with ongoing mortality and hospital events follow-up. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jan 18. 57(3):292-9.

138. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. Dec 4 2002. 288(21):2709-16.
139. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005 Oct 25. 112(17):2735-52.
140. Welsh JA, Sharma A, Cunningham SA, Vos MB. Consumption of added sugars and indicators of cardiovascular disease risk among US adolescents. *Circulation*. 2011 Jan 25. 123(3):249-57.
141. Buitrago-Lopez A, Sanderson J, Johnson L, et al. Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2011 Aug 26. 343: d4488.
142. Rugulies R. Depression as a predictor for coronary heart disease. a review and meta-analysis. *Am J Prev Med*. 2002 Jul. 23(1):51-61.
143. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, et al. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2000 Nov 14. 102(20):2473-8.
144. Hjemdahl P. Stress and the metabolic syndrome: an interesting but enigmatic association. *Circulation*. 2002 Nov 19. 106(21):2634-6.
145. Shah AJ, Veledar E, Hong Y, Bremner JD, Vaccarino V. Depression and history of attempted suicide as risk factors for heart disease mortality in young individuals. *Arch Gen Psychiatry*. 2011 Nov. 68(11):1135-42.
146. Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Cosin-Sales J, Aldama G, Pizzi C, Kaski JC. C-reactive protein elevation and disease activity in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2004 Mar. 25(5):401-8.
147. Qureshi WT, Rana JS, Yeboah J, Bin Nasir U, Al-Mallah MH. Risk stratification for primary prevention of coronary artery disease: roles of C-reactive protein and coronary artery calcium. *CurrCardiol Rep*. 2015 Dec. 17 (12):110.
148. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008 Nov 20. 359(21):2195-207.
149. Chan DC, Pang J, Hooper AJ, et al. Elevated lipoprotein(a), hypertension and renal insufficiency as predictors of coronary artery disease in patients with genetically confirmed heterozygous familial hypercholesterolemia. *Int J Cardiol*. 2015 Dec 15. 201:633-8.

150. Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 1998;49:31-62.
151. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA.* 1992; 268: 877–881.
152. Qujeq D, Omran TS, Hosini L. Correlation between total homocysteine, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in the serum of patients with myocardial infarction. *Clin Biochem.* 2001; 34: 97–101.
153. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang CH, Stampfer M. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA.* 2004; 291: 565–575.
154. Bonna KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K; NORVIT Trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1578–1588.
155. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1567–1577.
156. Gram J, Jespersen J, Kluft C, Rijken DC. On the usefulness of fibrinolysis variables in the characterization of a risk group for myocardial reinfarction. *Acta Med Scand.* 1987;221:149–153.
157. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blomback M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1985;313:1557–1563.
158. Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarti R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* 1993;342:1076–1079.
159. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Cromwell WC. Measurement issues related to lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol.* 2002 Oct 17. 90(8A):22i-29i.
160. Mendivil CO, Rimm EB, Furtado J, Chiuve SE, Sacks FM. Low-density lipoproteins containing apolipoprotein C-III and the risk of coronary heart disease. *Circulation.* 2011 Nov 8. 124(19):2065-72.

161. Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1984 Aug 23. 311(8):501-5.
162. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004 Sep 23. 351(13):1296-305.
163. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol*. 1997 Mar 1. 145(5):408-15.
164. Chung CP, Oeser A, Raggi P, et al. Increased coronary-artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis: relationship to disease duration and cardiovascular risk factors. *Arthritis Rheum*. 2005 Oct. 52(10):3045-53.
165. Sani MU. Myocardial disease in human immunodeficiency virus (HIV) infection: a review. *Wien KlinWochenschr*. 2008. 120(3-4):77-87.
166. Malkin CJ, Pugh PJ, Morris PD, Asif S, Jones TH, Channer KS. Low serum testosterone and increased mortality in men with coronary heart disease. *Heart*. 2010 Nov. 96(22):1821-5.
167. Dong JY, Zhang YH, Qin LQ. Erectile dysfunction and risk of cardiovascular disease meta-analysis of prospective cohort studies. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Sep 20. 58(13):1378-85.
168. Ingelsson E, Lundholm C, Johansson AL, Altman D. Hysterectomy and risk of cardiovascular disease: a population-based cohort study. *Eur Heart J*. 2011 Mar. 32(6):745-50.
169. Cappuccio FP, Cooper D, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Sleep duration predicts cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur Heart J*. 2011 Jun. 32(12):1484-92.
170. Laugsand LE, Vatten LJ, Platou C, Janszky I. Insomnia and the risk of acute myocardial infarction: a population study. *Circulation*. 2011 Nov 8. 124(19):2073-81.
171. Lu Wang, MD, PhD,\* , Yiqing Song, MD, ScD, , JoAnn E. Manson, MD, DrPH, Stefan Pilz, MD, Winfried März, MD, Karl Michaëlsson, MD, PhD, Annamari Lundqvist, PhD, Simerjot K. Jassal, MD, MAS, Elizabeth Barrett-Connor, MD, Cuilin Zhang, MD, PhD, Charles B. Eaton, MD, Heidi T. May, PhD, MSPH, Jeffrey L. Anderson, MD, and Howard D. Sesso, ScD Circulating Levels of 25Hydroxy-Vitamin D and Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Prospective Studies *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2012 November 1; 5(6): 819–829. doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.112.967604.



172. Kestenbaum B, Katz R, de Boer I, et al. Vitamin D, parathyroid hormone, and cardiovascular events among older adults. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Sep 27. 58(14):1433-41.
173. Rosenberg S, Elashoff MR, Beineke P, et al. Multicenter validation of the diagnostic accuracy of a blood-based gene expression test for assessing obstructive coronary artery disease in nondiabetic patients. *Ann Intern Med*. 2010 Oct 5. 153(7):425-34.
174. Wang TJ, Gona P, Larson MG, et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med*. 2006 Dec 21. 355(25):2631-9.
175. Wu CK, Lin JW, Caffrey JL, Chang MH, Hwang JJ, Lin YS. Cystatin C and long-term mortality among subjects with normal creatinine-based estimated glomerular filtration rates: NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey). *J Am Coll Cardiol*. 2010 Nov 30. 56(23):1930-6.
176. Ridker PM, Genest J, Boekholdt SM, et al. HDL cholesterol and residual risk of first cardiovascular events after treatment with potent statin therapy: an analysis from the JUPITER trial. *Lancet*. 2010 Jul 31. 376(9738):333-9.
177. Pollack A, Kontorovich AR, Fuster V, Dec GW. Viral myocarditis—diagnosis, treatment options, and current controversies. *Nat Rev Cardiol* 2015; 12: 670–680.
178. Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Transl Res* 2015; 167: 152–166.
179. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res* 2012; 94: 276–283.
180. Liu L, Wang Y, Cao ZY, Wang MM, Liu XM, Gao T et al. Up-regulated TLR4 in cardiomyocytes exacerbates heart failure after long-term myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 2015; 19: 2728–2740.
181. Venardos N, Nadlonek NA, Zhan Q, Weyant MJ, Reece TB, Meng X et al. Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation. *J Surg Res* 2014; 190: 1–8.
182. Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem* 2015; 6: 209–217.

183. McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ Res* 2015; 116: 1022–1033.
184. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 1998; 10: 349–350.
185. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1–5.
186. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–820.
187. Fairweather D, Frisancho-Kiss S. Mast cells and inflammatory heart disease: potential drug targets. *Cardiovasc HematolDisord Drug Targets* 2008; 8: 80–90.
188. de Laat MA, Gruntmeir KJ, Pollitt CC, McGowan CM, Sillence MN, Lacombe VA. Hyperinsulinemia down-regulates TLR4 expression in the mammalian heart. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 120.
189. Gawri R, Rosenzweig DH, Krock E, Ouellet JA, Stone LS, Quinn TM et al. High mechanical strain of primary intervertebral disc cells promotes secretion of inflammatory factors associated with disc degeneration and pain. *Arthritis Res Ther* 2014; 16: R21.
190. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 546–558.
191. Xu D, Yan S, Wang H, Gu B, Sun K, Yang X et al. IL-29 enhances LPS/TLR4-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Cell PhysiolBiochem* 2015; 37: 27–34.
192. Li H, Huang LF, Wen C, Yang ZC, Chen CY. Roles of cardiac mast cells and Toll-like receptor 4 in viral myocarditis among mice. *Zhongguo Dang Dai ErKe Za Zhi* 2013; 15: 896–902.
193. Senhaji N, Diakite B, Serbati N, Zaid Y, Badre W, Nadifi S. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: new data and a meta-analysis. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 206.
194. Fairweather D, Yusung S, Frisancho S, Barrett M, Gatewood S, Steele R et al. IL-12 receptor beta 1 and Toll-like receptor 4 increase IL-1 beta- and IL-18-associated myocarditis and coxsackievirus replication. *J Immunol* 2003; 170: 4731–4737.
195. Soraya H, Clanachan AS, Rameshrad M, Maleki-Dizaji N, Ghazi-Khansari M, Garjani A. Chronic treatment with metformin suppresses toll-

like receptor 4 signaling and attenuates left ventricular dysfunction following myocardial infarction. *Eur J Pharmacol* 2014; 737: 77–84.

196. Ding HS, Yang J, Chen P, Yang J, Bo SQ, Ding JW et al. The HMGB1-TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis. *Gene* 2013; 527: 389–393.

197. Zeng Q, Song R, Ao L, Weyant MJ, Lee J, Xu D et al. Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via modulation of ERK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *ArteriosclerThrombVasc Biol* 2013; 33: 1580–1590.

198. Bagheri B, Sohrabi B, Movassaghpour AA, Mashayekhi S, Garjani A, Shokri M et al. Hydrocortisone reduces Toll-like receptor 4 expression on peripheral CD14+ monocytes in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Iran Biomed J* 2014; 18: 76–81.

199. Satoh S, Yada R, Inoue H, Omura S, Ejima E, Mori T et al. Toll-like receptor-4 is upregulated in plaque debris of patients with acute coronary syndrome more than Toll-like receptor-2. *Heart Vessels* 2014; 31: 1–5.

200. Steward R, McNally FJ, Schedl P. Isolation of the dorsal locus of *Drosophila*. *Nature* 1984; 311: 262–265.

201. Mitchell JA, Ryffel B, Quesniaux VF, Cartwright N, Paul-Clark M. Role of pattern-recognition receptors in cardiovascular health and disease. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1449–1452.

202. Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ Res* 2011; 108: 1133–1145.

203. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 886–892.

204. Kang JY, Lee JO. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 917–941.

205. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10–14.

206. Takeuchi O, Kawai T, Muhlrardt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13: 933–940.

207. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 168–179.

208. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity* 2012; 37: 771–783.
209. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394–397.
210. Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 2005; 6: 565–570.
211. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002; 3: 667–672.
212. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1–14.
213. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 446–458.
214. Seimon TA, Obstfeld A, Moore KJ, Golenbock DT, Tabas I. Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 19794–19799.
215. Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 156–164.
216. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: e61–e64.
217. Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, Lio D, Caruso M, Hoffmann E et al. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA* 2004; 292: 2339–2340.
218. Koch W, Hoppmann P, Pfeufer A, Schomig A, Kastrati A. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. *Eur Heart J* 2006; 27: 2524–2529.
219. Edfeldt K, Bennet AM, Eriksson P, Frostegard J, Wiman B, Hamsten A et al. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2004; 25: 1447–1453.

220. Paul-Clark MJ, George PM, Gatheral T, Parzych K, Wright WR, Crawford D et al. Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors. *Pharmacol Ther* 2012; 135: 200–215.
221. Flannery S, Bowie AG. The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1981–1991.
222. Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z et al. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Mol Immunol* 2014; 58: 66–76.
223. Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010; 465: 885–890.
224. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3–9.
225. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 353–364.
226. Vallejo JG. Role of toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121: 1–10.
227. Terrell AM, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Morrell ED, Meldrum DR. Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* 2006; 26: 226–234.
228. Flohr TG, McCollough CH, Bruder H, Petersilka M, Gruber K, Suss C, Grasruck M, Stierstorfer K, Krauss B, Raupach R, Primak AN, Kuttner A, Achenbach S, Becker C, Kopp A, Ohnesorge BM (2006) First performance evaluation of a dual-source CT(DSCT) system. *Eur Radiol* 16:256–268
229. Kunimasa T, Sato Y, Sugi K, Moroi M (2005) Evaluation by multislice computed tomography of atherosclerotic coronary artery plaques in non-culprit, remote coronary arteries of patients with acute coronary syndrome. *Circ J* 69:1346–1351
230. Achenbach S, Ropers D, Hoffmann U, MacNeill B, Baum U, Pohle K, Brady TJ, Pomerantsev E, Ludwig J, Flachskampf FA, Wicky S, Jang IK, Daniel WG (2004) Assessment of coronary remodeling in stenotic and nonstenotic coronary atherosclerotic lesions by multidetector spiral computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 43:842–847
231. Mahnken AH, Koos R, Katoh M, Spuentrup E, Busch P, Wildberger JE, Kuhl HP, Gunther RW (2005) Sixteen-slice spiral CT versus MR imaging for the assessment of left ventricular function in acute myocardial infarction. *Eur Radiol* 15:714–720

232. Ohnesorge B, Flohr T, Becker C, Kopp AF, Schoepf UJ, Baum U, Knez A, Klingenberg-Regn K, Reiser MF (2000) Cardiac imaging by means of electrocardiographically gated multisection spiral CT: initial experience. *Radiology* 217:564–571
233. Willmann JK, Weishaupt D, Lachat M, Kobza R, Roos JE, Seifert B, Luscher TF, Marincek B, Hilfiker PR (2002) Electrocardiographically gated multidetector row CT for assessment of valvular morphology and calcification in aortic stenosis. *Radiology* 225:120–128
234. Moorjani N, Viola N, Ohri SK. Key Questions in Cardiac Surgery. Coronary Artery Disease.
235. Toshchakov V, Jones BW, Perera P-Y, et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat. Immunol.* 2002;3:392–398.
236. Chen Y, Rollins J, Paigen B, Wang X. Genetic and genomic insights into the molecular basis of atherosclerosis. *Cell metabolism* 2007;6:164-79.
237. Riad A, Westermann D, Zietsch C, Savvatis K, Becher PM, Bereswill S et al. TRIF is a critical survival factor in viral cardiomyopathy. *J Immunol* 2011; 186: 2561–2570.
238. Fuse K, Chan G, Liu Y, Gudgeon P, Husain M, Chen M et al. Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production. *Circulation* 2005; 112: 2276–2285.
239. Bachmaier K, Toya S, Malik AB. Therapeutic administration of the chemokine CXCL1/KC abrogates autoimmune inflammatory heart disease. *PLoS One* 2014; 9: e89647.
240. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T et al. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. *J Am Heart Assoc* 2014; 3: e001052.
241. Jenke A, Wilk S, Poller W, Eriksson U, Valaperti A, Rauch BH et al. Adiponectin protects against Toll-like receptor 4-mediated cardiac inflammation and injury. *Cardiovasc Res* 2013; 99: 422–431.
242. Frangogiannis NG. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol* 2015; 30: 240–245.
243. Haas B, Leonard F, Ernens I, Rodius S, Vausort M, Rolland-Turner M et al. Adenosine reduces cell surface expression of toll-like receptor 4 and inflammation in response to lipopolysaccharide and matrix products. *J Cardiovasc Transl Res* 2011; 4: 790–800.

244. Rohde D, Schon C, Boerries M, Didrihsone I, Ritterhoff J, Kubatzky KF et al. S100A1 is released from ischemic cardiomyocytes and signals myocardial damage via Toll-like receptor 4. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 778–794.
245. Schiopu A, Cotoi OS. S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 828354.
246. Zhang W, Lavine KJ, Epelman S, Evans SA, Weinheimer CJ, Barger PM et al. Necrotic myocardial cells release damage-associated molecular patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo. *J Am Heart Assoc* 2015; 4: e001993.
247. van der Pouw Kraan TC, Bernink FJ, Yildirim C, Koolwijk P, Baggen JM, Timmers L et al. Systemic toll-like receptor and interleukin-18 pathway activation in patients with acute ST elevation myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 67: 94–102.
248. Lu M, Tang F, Zhang J, Luan A, Mei M, Xu C et al. Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia/reperfusion in rats via regulation of Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Phytother Res* 2015; 29: 599–606.
249. Cai W, Zhang Y, Li J, Wang J. Kappa-opioid receptor agonist U50, 488H attenuates myocardial ischemia-reperfusion via modulating Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappaB signaling in rat. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2014; 42: 866–872.
250. Liu QP, Pan KY, Zhou X, Yu HL, Han GL, Li YM et al. Dynamic expression of toll like receptor 2 and 4 in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 2013; 29: 326–330.
251. Wang C, Sun H, Song Y, Ma Z, Zhang G, Gu X et al. Pterostilbene attenuates inflammation in rat heart subjected to ischemia-reperfusion: role of TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 1737–1746.
252. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 445–462.
253. Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, Shomura S, Takayama H, Fleisig AJ et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2006; 114: I270–I274.

254. Chen Y, Rothnie C, Spring D, Verrier E, Venardos K, Kaye D et al. Regulation and actions of activin A and follistatin in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cytokine* 2014; 69: 255–262.
255. Ha T, Li Y, Hua F, Ma J, Gao X, Kelley J et al. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovasc Res* 2005; 68: 224–234.
256. Hua F, Ha T, Ma J, Li Y, Kelley J, Gao X et al. Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Immunol* 2007; 178: 7317–7324.
257. Li C, Ha T, Kelley J, Gao X, Qiu Y, Kao RL et al. Modulating Toll-like receptor mediated signaling by (1→3)-beta-D-glucan rapidly induces cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 538–547.
258. Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H. M. and Packer, M. (1990) Elevated circulating levels of tumor-necrosis factor in severe chronic heart-failure. *N. Engl. J. Med.* 323, 236–241.
259. Mann, D. L. (2002) Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ. Res.* 91, 988–998.
260. Mann, D. L. (2003) Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 81–101.
261. Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y. D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R. T. and Kelly, R. A. (1999) Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J. Clin. Invest.* 104, 271–280.
262. Timmers, L., Sluijter, J. P., Van Keulen, J. K., Hoefler, I. E., Nederhoff, M. G., Goumans, M. J., Doevendans, P. A., van Echteld, C. J., Joles, J. A., Quax, P. H. et al. (2008) Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ. Res.* 102, 257–264.
263. Birks, E. J., Felkin, L. E., Banner, N. R., Khaghani, A., Barton, P. J. and Yacoub, M. H. (2004) Increased toll-like receptor 4 in the myocardium of patients requiring left ventricular assist devices. *J. Heart Lung Transplant.* 23, 228–235.
264. Mann, D. L., Topkara, V. K., Evans, S. and Barger, P. M. (2010) Innate immunity in the adult mammalian heart: for whom the cell tolls. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 121, 34–50. [64] K. Edfeldt, J. Swedenborg, G. K. Hansson, and Z.-Q. Yan, "Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation," *Circulation*, vol. 105, no. 10, pp. 1158–1161, 2002.



265. K. Edfeldt, J. Swedenborg, G. K. Hansson, and Z.-Q. Yan, "Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation," *Circulation*, vol. 105, no. 10, pp. 1158–1161, 2002.
266. K.W. Howell, X. Meng, D. A. Fullerton, C. Jin, T. B. Reece, and J. C. Cleveland Jr., "Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL induced macrophage differentiation to foam cells," *Journal of Surgical Research*, vol. 171, no. 1, pp. e27–e31, 2011.
267. K. Yang, X. J. Zhang, L. J. Cao et al., "Toll-like receptor 4 mediates inflammatory cytokine secretion in smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 4, Article ID e95935, 2014.
268. Y. S. Bae, J. H. Lee, S. H. Choi et al., "Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2," *Circulation Research*, vol. 104, no. 2, pp. 210–218, 2009.
269. Y. I. Miller, S. Viriyakosol, C. J. Binder, J. R. Feramisco, T. N. Kirkland, and J. L. Witztum, "Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 3, pp. 1561–1568, 2003.
270. S.-H. Choi, R. Harkewicz, J. H. Lee et al., "Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake," *Circulation Research*, vol. 104, no. 12, pp. 1355–1363, 2009.
271. Y. I. Miller, S.-H. Choi, P. Wiesner, and Y. S. Bae, "The SYK side of TLR4: signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL," *British Journal of Pharmacology*, vol. 167, no. 5, pp. 990–999, 2012.
272. H. Bjorkbacka, V. V. Kunjathoor, K. J. Moore et al., "Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 4, pp. 416–421, 2004.
273. K. S. Michelsen, M. H. Wong, P. K. Shah et al., "Lack of toll like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 29, pp. 10679–10684, 2004.
274. M. Higashimori, J. B. Tatro, K. J. Moore, M. E. Mendelsohn, J. B. Galper, and D. Beasley, "Role of toll-like receptor 4 in intimal foam cell

accumulation in apolipoprotein E-deficient mice,” *Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 31, no. 1, pp. 50–57, 2011.

275. K. R. Coenen, M. L. Gruen, R. S. Lee-Young, M. J. Puglisi, D. H. Wasserman, and A. H. Hasty, “Impact of macrophage toll-like receptor 4 deficiency on macrophage infiltration into adipose tissue and the artery wall in mice,” *Diabetologia*, vol. 52, no. 2, pp. 318–328, 2009.

276. G. Pasterkamp, A. H. Schoneveld, D. J. Hijnen et al., “Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery,” *Atherosclerosis*, vol. 150, no. 2, pp. 245–253, 2000.

277. S. C. G. Hollestelle, M. R. De Vries, J. K. Van Keulen et al., “Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling,” *Circulation*, vol. 109, no. 3, pp. 393–398, 2004.

278. Y. Ishikawa, M. Satoh, T. Itoh, Y. Minami, Y. Takahashi, and M. Akamura, “Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction,” *Clinical Science*, vol. 115, no. 3-4, pp. 133–140, 2008.

279. S. Gargiulo, P. Gamba, G. Testa et al., “Relation between TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway activation by 27-hydroxycholesterol and 4-hydroxynonenal, and atherosclerotic plaque instability,” *Aging Cell*, vol. 14, no. 4, pp. 569–581, 2015.

280. H.-L. Geng, H.-Q. Lu, L.-Z. Zhang et al., “Increased expression of Toll like receptor 4 on peripheral-blood mononuclear cells in patients with coronary arteriosclerosis disease,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 143, no. 2, pp. 269–273, 2006.

281. E.W. Raines, “The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease,” *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 81, no. 3, pp. 173–182, 2000.

282. W. Orr, J. M. Sanders, M. Bevard, E. Coleman, I. J. Sarembock, and M. A. Schwartz, “The subendothelial extracellular matrix modulates NF- $\kappa$ B activation by flow: a potential role in atherosclerosis,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 169, no. 1, pp. 191–202, 2005.

283. V. Shekhonin, S. P. Domogatsky, G. L. Idelson, V. E. Koteliansky, and V. S. Rukosuev, “Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries,” *Atherosclerosis*, vol. 67, no. 1, pp. 9–16, 1987.

284. E. S. White, F. E. Baralle, and A. F. Muro, "New insights into form and function of fibronectin splice variants," *Journal of Pathology*, vol. 216, no. 1, pp. 1–14, 2008.
285. P. Doddapattar, C. Gandhi, P. Prakash et al., "Fibronectin splicing variants containing extra domain A promote atherosclerosis in mice through Toll-like receptor 4," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 35, no. 11, pp. 2391–2400, 2015.
286. P. Prakash, P. P. Kulkarni, S. R. Lentz, and A. K. Chauhan, "Cellular fibronectin containing extra domain A promotes arterial thrombosis in mice through platelet Toll-like receptor 4," *Blood*, vol. 125, no. 20, pp. 3164–3172, 2015.
287. Balistreri CR, Colonna-Romano G, Lio D, Candore G, Caruso C. 2009. TLR4 polymorphism and aging: implications for the pathophysiology of age-related disease. *Journal of Clinical Immunology* 29:406–415 DOI 10.1007/s10875-009-9297-5.
288. Smirnova I, Poltorak A, Chan EK, McBride C, Beutler B. 2000. Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus TLR4. *Genome Biology* 1(1): research002-research002.10 DOI 10.1186/gb-2000-1-1-research002.
289. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics* 25:187–191 DOI 10.1038/76048.
290. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. 2002. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *The New England Journal of Medicine* 347:185–192 DOI 10.1056/NEJMoa012673.
291. Boekholdt SM, Agema WRP, Peters RJG, Zwinderman AH, Wall EE, Reitsma PH, Kastelein JJP, Jukema JW, on behalf of the Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS) Study Group. 2003. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation* 107:2416–2421 DOI 10.1161/01.CIR.0000068311.40161.28.
292. Kolek MJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Whiting BM, Horne BD, Bair TL, Anderson JL. 2004. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *American Heart Journal* 148:1034–1040 DOI 10.1016/j.ahj.2004.05.049.

293. Berg KK, Madsen HO, Garred P, Wiseth R, Gunnes S, Videm V. 2009. The additive contribution from inflammatory genetic markers on the severity of cardiovascular disease. *Scandinavian Journal of Immunology* 69:36–42 DOI 10.1111/j.1365-3083.2008.02187.x.
294. Morange PE, Tiret L, Saut N, Luc G, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, Evans A, Ducimetiere P, Cambien F, Juhan-Vague I, on behalf of the PRIME Study group. 2004. TLR4/Asp299Gly, CD14/C-260T, plasma levels of the soluble receptor CD14 and the risk of coronary heart disease: the PRIME Study. *European Journal of Human Genetics* 12:1041–1049 DOI 10.1038/sj.ejhg.5201277.
295. Zee RYL, Hegener HH, Gould J, Ridker PM. 2005. Toll-like receptor 4 Asp299Gly gene polymorphism and risk of atherothrombosis. *Stroke* 36:154–157 DOI 10.1161/01.STR.0000149948.31879.f0.
296. O'Halloran AM, Stanton A, O'Brien E, Shields DC. 2006. The impact on coronary artery disease of common polymorphisms known to modulate responses to pathogens. *Annals of Human Genetics* 70:934–945 DOI 10.1111/j.1469-1809.2006.00281.x.
297. Nebel A, Flachsbarth F, Schafer A, Nothnagel M, Nikolaus S, Mokhtari NEE, Schreiber S. 2007. Role of the toll-like receptor 4 polymorphism Asp299Gly in longevity and myocardial infarction in German men. *Mechanisms of Ageing and Development* 128:409–411 DOI 10.1016/j.mad.2007.04.001.
298. Beijk MAM, Boekholdt SM, Rittersma SZH, Pons D, Zwinderman AH, Doevendans PAF, Tio RA, Tijssen JGP, Jukema JW, DeWinter RJ. 2010. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms show no association with the risk of clinical or angiographic restenosis after percutaneous coronary intervention. *Pharmacogenetics and Genomics* 20:544–552 DOI 10.1097/FPC.0b013e32833d7b29.
299. Dzumahur A, Zibar L, Wagner J, Simundic T, Dembic Z, Barbic J. 2012. Association studies of gene polymorphisms in toll-like receptors 2 and 4 in Croatian patients with acute myocardial infarction. *Scandinavian Journal of Immunology* 75:517–523 DOI 10.1111/j.1365-3083.2012.02681.x.
300. Martinez-Rios MA, Vargas-Alarcón G, Vallejo M, Cruz-Martinez E, Perez-Mendez O, Medina-Andrade A, Torre-Garcia MD, Pena-Duque MA, Fragoso JM. 2013. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and acute coronary syndrome: no association in a Mexican population. *Archivos de Cardiología de México* 83(4):257–262 DOI 10.1016/j.acmx.2013.09.001.
301. Golovkin AS, Ponasenkov AV, Khutornaya MV, Kutikhin AG, Salakhov RR, Yuzhalin AE, Zhidkova II, Barbarash OL, Barbarash LS. 2014. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphism with risk of coronary

artery disease in a Russian population. *Gene* 550:101–109 DOI 10.1016/j.gene.2014.08.022.

302. Guven M, Ismailoglu Z, Batar B, Unal S, Onaran I, Karadag B, Ongen Z. 2015. The effect of genetic polymorphisms of TLR2 and TLR4 in Turkish patients with coronary artery disease. *Gene* 568:99–102 DOI 10.1016/j.gene.2014.12.047.

303. Yang IA, Holloway JW, Ye S. 2003. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis* 170:187–190 DOI 10.1016/S0021-9150(03)00286-7.

304. Hernesniemia J, Lehtimäki T, Rontu R, Islam MS, Eklund C, Mikkelsen J, Ilveskoski E, Kajander O, Goebeler S, Viiri LE, Hurme M, Karhunen PJ. 2006. Toll-like receptor 4 polymorphism is associated with coronary stenosis but not with the occurrence of acute or old myocardial infarctions. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 66:667–675 DOI 10.1080/00365510600933011.

305. Netea MG, Hijmans A, Wissen S, Smilde TJ, Trip MD, Kullberg BJ, De Boo T, Van der Meer JWM, Kastelein JJP, Stalenhorf AFH. 2004. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. *European Journal of Clinical Investigation* 34:94–99 DOI 10.1111/j.1365-2362.2004.01303.x.

306. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R & King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004 27 1047–1053 doi:10.2337/diacare.27.5.1047.

307. Lirussi F. The global challenge of type 2 diabetes and the strategies for response in ethnic minority groups. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 2010 26 421–432doi:10.1002/dmrr.1105.

308. Wilson PW, Meigs JB, Sullivan L, Fox CS, Nathan DM & D'Agostino RB Sr.. Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Archives of Internal Medicine* 2007 167 1068–1074doi:10.1001/archinte.167.10.1068.

309. Talmud PJ, Hingorani AD, Cooper JA, Marmot MG, Brunner EJ, Kumari M, Kivimäki M & Humphries SE. Utility of genetic and non-genetic risk factors in prediction of type 2 diabetes: Whitehall II prospective cohort study. *BMJ* 2010 340 b4838doi:10.1136/bmj.b4838.

310. Moran LJ, Misso ML, Wild RA & Norman RJ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2010 16 347–363doi:10.1093/humupd/dmq001.

311. Dasu MR, Devaraj S, Park S & Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2010 33 861–868doi:10.2337/dc09-1799.
312. Hodgkinson CP, Laxton RC, Patel K & Ye S. Advanced glycation end-product of low density lipoprotein activates the toll-like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008 28 2275–2281.
313. Rudofsky G Jr., Reismann P, Witte S, Humpert PM, Isermann B, Chavakis T, Tafel J, Nosikov VV, Hamann A, Nawroth P & Bierhaus A. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004 27 179–183doi:10.2337/diacare.27.1.179.
314. Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Tarach J & Ksiazek A. Toll-like receptor 4 gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Human Immunology* 2009 70 121–124. doi: 10.1016/j.humimm.2008.12.003.
315. Holloway JW, Yang IA & Ye S. Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005 15 15–21doi:10.1097/01213011-200501000-00003.
316. American Diabetes Association Standards of medical care in diabetes – 2009. *Diabetes Care* 32:2009S13–S61.
317. Cannon CP, Battler A, Brindis RG, Cox JL, Ellis SG, Every NR, Flaherty JT, Harrington RA, Krumholz HM, Simoons ML, Van De Werf FJ, Weintraub WS, Mitchell KR, Morrisson SL, Brindis RG, Anderson HV, Cannon DS, Chitwood WR, Cigarroa JE, Collins-Nakai RL, Ellis SG, Gibbons RJ, Grover FL, Heidenreich PA, Khandheria BK, Knoebel SB, Krumholz HL, Malenka DJ, Mark DB, McKay CR, Passamani ER, Radford MJ, Riner RN, Schwartz JB, Shaw RE, Shemin RJ, Van Fossen DB, Verrier ED, Watkins MW, Phoubandith DR & Furnelli T. American College of Cardiology key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with acute coronary syndromes. A report of the American College of Cardiology task force on clinical data standards (acute coronary syndromes writing committee). *Journal of the American College of Cardiology* 2001 38 2114–2130doi:10.1016/S0735-1097(01)01702-8.
318. The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee Myocardial infarction redefined – a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *European Heart Journal* 2000 21 1502–1513doi:10.1053/euhj.2000.2305.

319. Bagarolli RA, Saad MJ & Saad ST. Toll-like receptor 4 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications* 2010 24 192–198doi:10.1016/j.jdiacomp.2009.03.003.
320. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW & Netea MG. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Molecular Medicine* 2008 14 346–352doi:10.2119/2007-00135.
321. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermsen CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rúa C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW & Netea MG. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *PNAS* 2007 104 16645–16650doi:10.1073/pnas.0704828104.1 35.
322. Stamatoyannopoulos G & Fessas P. Thalassaemia, glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency, sickling, and malarial endemicity in Greece: a study of five areas. *BMJ* 1964 1 875–879doi:10.1136/bmj.1.5387.875. 36.
323. Samara M, Chiotoglou I, Kalamaras A, Likousi S, Chassanidis C, Vagenas A, Vagenas C, Eftichiadis E, Vamvakopoulos N, Patrinos GP & Kollia P. Large scale-population genetic analysis for hemoglobinopathies reveals different mutation spectra in Central Greece compared to the rest of the country. *American Journal of Hematology* 2007 82 634–636doi:10.1002/ajh.20889.
324. Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, Doulas M, Tsironidou V, Rafail S, Kartalis G, Speletas M & Ritis K. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clinical Genetics* 2007 71 458–467doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00789.x.
325. Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Tiaka EK, Satra M, Gerovassili A, Tsiompanidis I, Vamvakopoulos N & Potamianos SP. Impact of TLR-4 polymorphisms on circulating levels of antibodies against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2010 15 481–482doi:10.1111/j.1523-5378.2010.00785.x.
326. Speletas M, Kalala F, Mitroulis I, Papadopoulos V, Merentiti V, Germanis AE & Ritis K. TLR2 and TLR4 polymorphisms in familial Mediterranean fever. *Human Immunology* 2009 70 750–753doi:10.1016/j.humimm.2009.05.004.

327. den Dekker WK, Cheng C, Pasterkamp G, Duckers HJ. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis* 2010; 209: 314–320, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.09.075.52
328. Aumont, M. C., Seknadji, P., Lamotte, M., Lebret, D., Ollivier, V. de Prost, D. (2003) Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, e61–e64.249.
329. Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, Hemming VG, Blanco JC, Segal DM & Vogel SN. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *Journal of Immunology* 2006 177 322–332. 21.
330. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G & Zitvogel L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine* 2007 13 1050–1059 doi:10.1038/nm1622. 42.
331. Prohinar P, Rallabhandi P, Weiss JP & Gioannini TL. Expression of functional D299G.T399I polymorphic variant of TLR4 depends more on coexpression of MD-2 than does wild-type TLR4. *Journal of Immunology* 2010 184 4362–4367 doi:10.4049/jimmunol.0903142.
332. Vimalaswaran KS & Loos RJ. Progress in the genetics of common obesity and type 2 diabetes. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2010 12 e7 doi:10.1017/S1462399410001389.
333. McCarthy MI & Zeggini E. Genome-wide association studies in type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports* 2009 9 164–171 doi:10.1007/s11892-009-0027-4.
334. Morales J, Welter D, Bowler EH, Cerezo M, Harris LW, McMahon AC, Hall P, Junkins HA, Milano A, Hastings E, Malangone C, Buniello A, Burdett T, Flicek P, Parkinson H, Cunningham F, Hindorf LA, MacArthur JAL. A standardized framework for representation of ancestry data in genomics studies, with application to the NHGRI-EBI GWAS Catalog. *Genome Biol.* 2018 Feb 15;19(1):21. doi: 10.1186/s13059-018-1396-2
335. Ehrentraut H, Weber C, Ehrentraut S, Schwederski M, Boehm O, Knuefermann P et al. The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy. *Eur J Heart Fail* 2011; 13: 602–610.



336. Louwe MC, Karper JC, de Vries MR, Nossent AY, Bastiaansen AJ, van der Hoorn JW et al. RP105 deficiency aggravates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *Int J Cardiol* 2014; 176: 788–793.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ