

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ-
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΕΣ**

ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτης της αγγειογενετικής δράσης του νευρικού αυξητικού
παράγοντα (NGF) σε μοντέλο ισχαιμίας οπίσθιων άκρων
κονίκλων**

ΚΑΡΑΤΖΑΣ ΑΝΔΡΕΑΣ

ΙΑΤΡΟΣ ΑΚΤΙΝΟΔΙΑΓΝΩΣΤΗΣ

ΠΑΤΡΑ 2014

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δημήτριο Σιαμπλή, διευθυντή του κλινικού εργαστηρίου Ακτινολογίας για την καθοριστική του στήριξη στην έναρξη και ολοκλήρωση του συγκεκριμένου επιστημονικού πρωτοκόλλου. Ευχαριστώ επίσης τον Αν. Καθηγητή Τσοπάνογλου Νικόλαο για τη διαρκή καθοδήγηση και στενή συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και της συγγραφής του διδακτορικού. Ευχαριστώ τον Καθηγητή Πέτσα Θεόδωρο για τις συμβουλές και παρεμβάσεις του στην εργασία. Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω τον Αν. Καθηγητή Καρναμπατίδη Δημήτριο για τη βοήθεια στην οργάνωση του πειραματικού πρωτοκόλλου και τη σημαντική καθοδήγηση και στήριξη σε όλη τη διάρκεια της έρευνας. Ευχαριστώ επίσης τους καθηγητές Τσολάκη Ιωάννη, Αλεξόπουλο Δημήτριο και Παπαχρήστου Διονύσιο για την τιμή να συμμετέχουν στην επταμελή επιτροπή. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στους φίλους και συνεργάτες που αφιέρωσαν πολλές ώρες του ελεύθερου χρόνου τους, βοηθώντας στην πραγματοποίηση των πειραμάτων και συγκεκριμένα στους Αθανάσιο Διαμαντόπουλο, Κωνσταντίνο Κατσάνο, Παναγιώτη Κίτρου και Σταύρο Σπηλιόπουλο. Ευχαριστώ τον καθηγητή Philip Lazaronici και τους συνεργάτες του από το πανεπιστήμιο της Ιερουσαλήμ, οι οποίοι μας παρείχαν της ουσίες που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα και συνετέλεσαν με την εμπειρία τους στη βελτίωση του πειραματικού πρωτοκόλλου. Ευχαριστώ την καθηγήτρια Πέτρου Παπαδάκη Ελένη και τον κύριο Λίλη Ιωάννη από το εργαστήριο Ανατομίας, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών για την επεξεργασία των ιστολογικών δεδομένων. Θα ήθελα τέλος να ευχαριστήσω την γραμματέα του τμήματος επεμβατικής ακτινολογίας κυρία Θεώνη Καπλανίδου για την συμμετοχή της στην ολοκλήρωση του διδακτορικού.

Στην οικογένειά μου

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

1. ΣΙΑΜΠΛΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, τ. Καθηγητής Ακτινολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
2. ΠΕΤΣΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ, Καθηγητής Ακτινολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
3. ΤΣΟΠΑΝΟΓΛΟΥ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής
Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

1. ΣΙΑΜΠΛΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, τ. Καθηγητής Ακτινολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
2. ΠΕΤΣΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ, Καθηγητής Ακτινολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
3. ΤΣΟΠΑΝΟΓΛΟΥ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής
Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
4. ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Καθηγητής Καρδιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
5. ΤΣΟΛΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
6. ΚΑΡΝΑΜΠΑΤΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής
Ακτινολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
7. ΠΑΠΑΧΡΗΣΤΟΥ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής
Ανατομίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I. Γενικό μέρος

A. Περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια

1. Ορισμός-Κλινικές εκδηλώσεις.....	8
2. Επιδημιολογία.....	11
3. Παράγοντες κινδύνου.....	13
4. Διάγνωση.....	14
5. Συντηρητική θεραπεία.....	19
6. Ενδοαγγειακή-Χειρουργική θεραπεία.....	20
7. Περιορισμοί υπαρχουσών θεραπευτικών μεθόδων και μελλοντικές θεραπευτικές προοπτικές.....	24

B. Διεργασίες δημιουργίας νέων αγγείων25

1. Ενδοθηλιογένεση.....	25
2. Αγγειογένεση.....	26
3. Αρτηριογένεση.....	30

Γ. Θεραπευτική αγγειογένεση.....33

1. Νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF).....	33
i. Ιστορική αναδρομή-Γενικές πληροφορίες.....	33
ii. Δομή του NGF.....	35
iii. Σύμπλεγμα 7S NGF.....	38
iv. Υποδοχείς Trk.....	39
v. Επίδραση του NGF στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων in vitro.....	40
vi. Αγγειογενετική δράση του NGF in vivo.....	42
vii. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στον NGF και τον VEGF....	44
viii. Ο ρόλος του NGF στην αγγειογένεση κατά την επούλωση πληγών.....	46
ix. Ο ρόλος του NGF στην αγγειογένεση κατά την ισχαιμία.....	47
x. Ο ρόλος του NGF στην αγγειογένεση σε όγκους	48
2. Θρομβίνη.....	51

i. Φυσιολογία της θρομβίνης.....	51
ii. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στο σύστημα πήξης και τις διαδικασίες αγγειογένεσης.....	53
iii. Ρόλος της θρομβίνης στην αγγειογένεση.....	54
3. Άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες.....	58
i. Γονίδια στόχοι για αυξητικούς παράγοντες.....	58
ii. Γονίδια στόχοι για μικρά μόρια.....	66
iii. Κύτταρα στόχοι.....	72

II. Ειδικό μέρος

Επιστημονικός σκοπός.....	91
---------------------------	----

A. Υλικά και μέθοδος

1. Σχεδιασμός του πειραματικού πρωτοκόλλου.....	91
2. Τεχνική του πειραματικού πρωτοκόλλου.....	93
i. Διαωτιαία πρόσβαση.....	93
ii. Ενδοαγγειακός εμβολισμός κάτω άκρων.....	103
iii. Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν.....	107
iv. Χορήγηση των ουσιών που μελετήθηκαν.....	109
3. Μελέτη της επαναγγείωσης.....	112
i. Αξονική τομογραφία αιμάτωσης (CT perfusion).....	113
ii. Ψηφιακή ενδοαρτηριακή αγγειογραφία.....	121
iii. Ποσοτικοποίηση της ψηφιακής αγγειογραφίας.....	122
iv. Ιστολογική εξέταση.....	125
4. Στατιστική ανάλυση.....	126

B. Αποτελέσματα

1. Αποτελέσματα αξονικής αγγειογραφίας αιμάτωσης-Αγγειογένεση.....	127
i. NGF.....	127
ii. Θρομβίνη.....	128
iii. Αναστολείς των υποδοχέων.....	129
iv. Συνδυασμός αναστολέων των υποδοχέων και NGF	130
v. Ιστολογική εξέταση.....	132
vi. Μέσος χρόνος διέλευσης και παράγοντας τριχοειδικής διαπερατότητας.....	134

vii. Συμπέρασμα.....	134
2. Αποτελέσματα αγγειογραφίας-Αρτηριογένεση.....	134
i. NGF.....	135
ii. Θρομβίνη.....	135
iii. Αναστολείς των υποδοχέων.....	136
iv. Συνδυασμός αναστολέων των υποδοχέων και NGF.....	136
v. Ιστολογική εξέταση.....	139
vi. Συμπέρασμα.....	140
γ. Συζήτηση.....	141
Δ. Βιβλιογραφία.....	148
Ε. Περίληψη.....	172
ΣΤ. Abstract.....	174
Ζ. Παρουσιάσεις σε συνέδρια.....	175
Η. Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά με κριτή.....	176

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια

1. Ορισμός-Κλινικές εκδηλώσεις

Η περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων (ΠΑΑΚΑ) είναι η νόσος που προκαλείται από τη στένωση ή απόφραξη των αρτηριών των κάτω άκρων. Συνήθως η αιτιολογία αυτών των στενώσεων είναι η αθηρωματική νόσος και έτσι η ΠΑΑΚΑ συνδέεται στενά με τις κλινικές εκδηλώσεις της αθηρωματικής νόσου σε άλλα αγγεία του σώματος, όπως η στεφανιαία νόσος.

Η συμπτωματολογία της ΠΑΑΚΑ σταδιοποιείται με βάση τις κλίμακες Fontaine και Rutherford (Πίνακας 1)

Fontaine		Rutherford		
Στάδιο	Κλινική εικόνα	Βαθμός	Κατηγορία	Κλινική εικόνα
I	Ασυμπτωματικός	0	0	Ασυμπτωματικός
IIa	Ήπια διαλείπουσα χωλότητα	I	1	Ήπια διαλείπουσα χωλότητα
IIb	Μέτρια και σοβαρή διαλείπουσα χωλότητα	I	2	Μέτρια διαλείπουσα χωλότητα
		I	3	Σοβαρή διαλείπουσα χωλότητα
III	Άλγος ηρεμίας	II	4	Άλγος ηρεμίας
IV	Έλκος ή γάγγραινα	III	5	Μικρής έκτασης απώλεια ιστού
		III	6	Μεγάλης έκτασης απώλεια ιστού

Πίνακας 1: Ταξινόμηση της Περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας. Πίνακας από το έγγραφο TASC II[1].

Πολλοί από τους ασθενείς με ΠΑΑΚΑ είναι ασυμπτωματικοί ή εμφανίζουν άτυπα συμπτώματα. Σε αυτούς τους ασθενείς η διάγνωση τίθεται από την απουσία περιφερικών σφύξεων ή το μειωμένο σφυροβραχιόνιο δείκτη. Είναι αξιοσημείωτο ότι και οι ασυμπτωματικοί ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών επεισοδίων.

Η πιο τυπική εκδήλωση της ΠΑΑΚΑ είναι η διαλείπουσα χωλότητα. Πρόκειται για άλγος στις γαστροκνημίες, το οποίο εμφανίζεται κατά τη βάρδια και υποχωρεί ταχέως κατά την ανάπαυση. (Στάδιο II κατά Fontaine, grade I κατά Rutherford). Σε κεντρικές στενώσεις, όπως των λαγονίων αρτηριών, το άλγος μπορεί να εκδηλώνεται στους γλουτούς ή στους μηρούς. Το άλγος αυτό είναι σημαντικό να διαφοροδιαγνωστεί από το άλγος που σχετίζεται με φλεβική ανεπάρκεια, οστεοαρθροπάθεια, περιφερική νευροπάθεια και σπονδυλική στένωση.

Σε πιο σοβαρές περιπτώσεις εμφανίζεται άλγος ηρεμίας κατά την κατάκλιση (Στάδιο III κατά Fontaine, grade II κατά Rutherford). Το άλγος ηρεμίας εντοπίζεται πιο συχνά στο άκρο πόδι και πρέπει να διαφορογιγνώσκειται από αρθρίτιδα ή μυϊκή κράμπα. Οι ασθενείς αναφέρουν επίσης μόνιμη ψυχρότητα στα άκρα τους.

Τα έλκη και η γάγγραινα εμφανίζονται συνήθως στα δάκτυλα των ποδιών ή στον άκρο πόδα. Τα αρτηριακά έλκη, προκαλούνται από την ανεπαρκή αιμάτωση των ιστών εξαιτίας της ΠΑΑΚΑ και είναι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ιδιαίτερα επώδυνα. Πολλές φορές είναι απότοκα τραύματος, ακόμα και μικροτραυματισμού και πρέπει να τα διαχωρίσει κανείς από τα φλεβικά έλκη, τα οποία οφείλονται στη φλεβική ανεπάρκεια που προκαλεί στάση του αίματος στα κάτω άκρα.

Όταν το άλγος απουσιάζει τίθεται η υποψία περιφερικής νευροπάθειας. Τα έλκη συχνά επιπλέκονται από τοπική λοίμωξη και φλεγμονή.



Εικόνα 1: Παράδειγμα κρίσιμης ισχαιμίας δεξιού κάτω άκρου σε άρρενα ασθενή με αναφερόμενο άλγος ηρεμίας, παρουσία τροφικού έλκους και ξηρή γάγγραινα του 1ου δακτύλου.

Η κρίσιμη ισχαιμία αποτελεί την πιο σοβαρή εκδήλωση της ΠΑΑΚΑ. Ορίζεται ως η παρουσία άλγους ηρεμίας ή ισχαιμικών δερματικών αλλοιώσεων ή γάγγραινας, τα οποία αποδίδονται σε αποφρακτική αρτηριοπάθεια (στάδια III και IV κατά Fontaine και κατηγορία 4-6 κατά Rutherford).

Εκτός από τις εκδηλώσεις που σχετίζονται άμεσα με τα κάτω άκρα, η περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια, όπως αναφέρθηκε, έχει στενή συσχέτιση και με τις λοιπές εκδηλώσεις της αθηρωματικής

νόσου. Οι πάσχοντες έχουν 4-5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να καταλήξουν από ένα μείζον καρδιαγγειακό επεισόδιο (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο). Αυτό οδηγεί σε ένα συνολικό κίνδυνο θνησιμότητας 2-3 φορές μεγαλύτερο από τους μη πάσχοντες[2].

2. Επιδημιολογία

Η επιδημιολογία της ΠΑΑΚΑ έχει μελετηθεί σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένων αρκετών στην Ευρώπη. Σε σχετικά πρόσφατη μελέτη που έγινε στη Σουηδία σε ασθενείς 60-90 ετών ο επιπολασμός της ήταν 18% και ο επιπολασμός της διαλείπουσας χωλότητας 7%[3]. Στις περισσότερες μελέτες το 1/3 των ασθενών με περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια είναι συμπτωματικοί. Ο επιπολασμός της κρίσιμης ισχαιμίας είναι αρκετά χαμηλότερος και στη συγκεκριμένη μελέτη σε ασθενείς άνω των 60 ετών ήταν της τάξης του 0,4%. Η εκτιμώμενη ετήσια επίπτωση της κρίσιμης ισχαιμίας κυμαίνεται ανάμεσα σε 500-1000 νέες περιπτώσεις ανά 1.000.000 κατοίκων, με μεγαλύτερη επίπτωση ανάμεσα σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Η συχνότητα της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων σχετίζεται άμεσα με την ηλικία. Είναι σχετικά ασυνήθης πριν τα 50 έτη και αυξάνεται απότομα σε μεγαλύτερες ηλικίες. Σε μελέτη που έγινε στη Γερμανία, ο επιπολασμός της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων ήταν 3% σε άνδρες ηλικίας 45-49 ετών και έφτανε το 18,2% σε ηλικίες 70-75 ετών[4]. Τα αντίστοιχα ποσοστά σε γυναίκες ίδιας ηλικίας ήταν 2,7% και 10,8%.

Όσον αφορά τη συχνότητα της νόσου στα δύο φύλα, τα στοιχεία ποικίλουν σε διάφορες μελέτες. Γενικά, φαίνεται ότι η συχνότητα της νόσου εξισώνεται στα δύο φύλα, όσο μεγαλώνει η ηλικία. Στη μελέτη

Framingham[5], η επίπτωση της διαλείπουσας χωλότητας στους άνδρες αυξήθηκε από 0,4/1000 σε ηλικίες 34-45 ετών σε 6/1000 σε ηλικίες άνω των 65 ετών. Η επίπτωση στις γυναίκες ήταν η μισή περίπου στις νέες ηλικίες, αλλά ήταν παρόμοια με τους άνδρες σε μεγαλύτερες ηλικίες.

Η ετήσια επίπτωση των μειζόνων ακρωτηριασμών κυμαίνεται μεταξύ 120-500 ανά 1.000.000 ατόμων του γενικού πληθυσμού[1]. Από αυτούς τους ακρωτηριασμούς, οι μισοί περίπου είναι άνωθεν του αστραγάλου. Η πρόγνωση αυτών των ασθενών είναι φτωχή. Δύο έτη μετά από έναν ακρωτηριασμό κάτωθεν του γόνατος, το 30% των ασθενών θα καταλήξει, 15% θα υποβληθεί σε ακρωτηριασμό άνωθεν του γόνατος, 15% θα υποβληθεί σε ακρωτηριασμό στο ετερόπλευρο άκρο και μόνο το 40% διατηρεί πλήρη κινητικότητα.

Η εξέλιξη στο μέλλον της συχνότητας της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων είναι δύσκολο να προβλεφθεί. Ο ενδεχόμενος περιορισμός της συχνότητας του καπνίσματος και ο αποτελεσματικότερος έλεγχος του σακχαρώδη διαβήτη ενδέχεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της νόσου. Από την άλλη πλευρά, η αυξημένη επιβίωση των ασθενών με στεφανιαία νόσο και ισχαιμικά έμφρακτα του εγκεφάλου, πιθανώς να επιτρέψει την εκδήλωση της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Περιορισμένα στοιχεία τις τελευταίες δεκαετίες δείχνουν μία μείωση στη διαλείπουσα χωλότητα. Ενδεικτικά η μελέτη Framingham[6] έδειξε μείωση της επίπτωσης από 282/100.000 ανά έτος τη δεκαετία 1950-1959 σε 225/100.000 ανά έτος τη δεκαετία 1990-1999.

3. Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες που αυξάνουν τη συχνότητα της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων συμπίπτουν με τους γνωστούς παράγοντες που προκαλούν αθηροσκλήρωση. Ορισμένοι από αυτούς τους παράγοντες δείχνουν να επηρεάζουν την περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων περισσότερο από ότι τη στεφανιαία νόσο, με το κάπνισμα να αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα [7, 8]. Το κάπνισμα στις περισσότερες μελέτες αποτελεί σταθερά ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου και η επίδρασή του είναι δόσοεξαρτώμενη. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς με διαλείπουσα χωλότητα έχουν καπνίσει κάποια στιγμή στη ζωή τους, ενώ η διακοπή του καπνίσματος οδηγεί σε ταχεία μείωση της επίπτωσης της διαλείπουσας χωλότητας, η οποία εξισώνεται με αυτή των μη καπνιστών μετά από ένα έτος[9].

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ένας επιπλέον παράγοντας κινδύνου, ο οποίος είναι πολύ σημαντικός για την περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων. Ο σακχαρώδης διαβήτης αυξάνει σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στη στεφανιαία νόσο τις σοβαρές εκδηλώσεις της νόσου, όπως έλκος και γάγγραινα όχι όμως τη διαλείπουσα χωλότητα, στην οποία έχει παρόμοια επίδραση με την επίδραση στη στεφανιαία νόσο [7, 8].

Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν συσχέτιση της υπέρτασης με την περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων. Εντούτοις, η ερμηνεία αυτών των ευρημάτων είναι δυσχερής, καθώς η αρτηριακή πίεση αποτελεί μέρος του ορισμού της νόσου (σφυροβραχιόνιος δείκτης, όπως αναπτύσσεται παρακάτω). Ενδεχομένως η υπέρταση επηρεάζει το βαθμό της ισχαιμίας και της

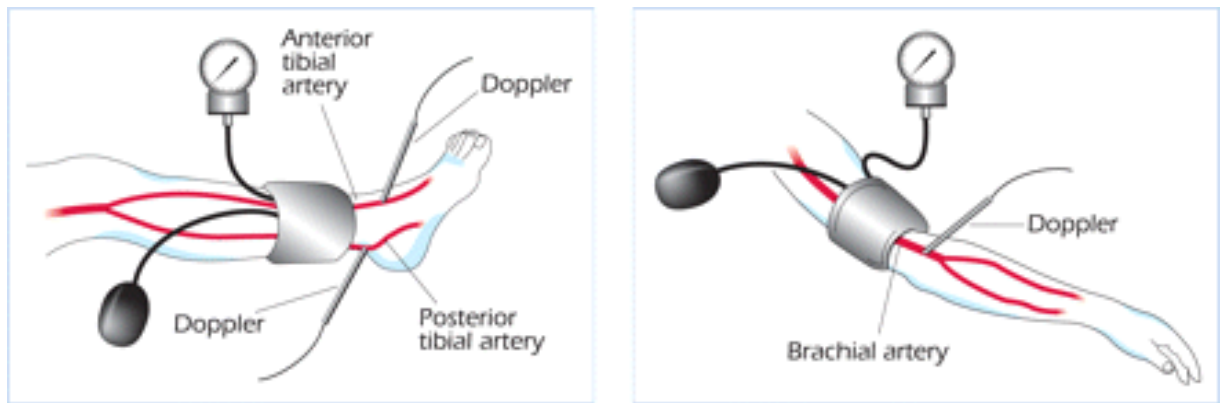
εμφάνισης συμπτωμάτων. Πάντως, η υπέρταση στη Limburg PAOD μελέτη, σχετίζεται με αύξηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων κατά 2,8 φορές [10] και στη μελέτη του Rotterdam ο χαμηλός σφυροβραχιόνιος δείκτης ($ABI < 0,9$) σχετίστηκε με αυξημένη διαστολική όσο και συστολική πίεση [11].

Οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν επίσης συσχέτιση της υψηλής ολικής χοληστερόλης και της χαμηλής HDL με την περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων. Στη μελέτη US Physicians Health Study ο λόγος ολική χοληστερόλη προς HDL, αποτελεί τον πιο ισχυρά σχετιζόμενο με τη νόσο λιπαιμικό δείκτη [12].

Άλλοι παράγοντες οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με την περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων, αλλά η σχέση τους δεν είναι αρκετά τεκμηριωμένα είναι η παχυσαρκία, το αλκοόλ και τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα. Πρόσφατα αιμοστατικοί παράγοντες και δείκτες φλεγμονής, όπως το ινωδογόνο στο πλάσμα και η C αντιδρώσα πρωτεΐνη έχουν συσχετιστεί με την περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων, χωρίς ωστόσο να είναι σαφές αν αποτελούν την αιτία ή το αποτέλεσμα της νόσου [12].

4. Διάγνωση

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μη επεμβατική μέτρηση για τη διάγνωση της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων είναι η μέτρηση του σφυροβραχιονίου δείκτη (ABI), δηλαδή του λόγου της συστολικής πίεσης σε κάθε κάτω άκρο προς τη συστολική πίεση στο άνω άκρο (Εικόνα 2).

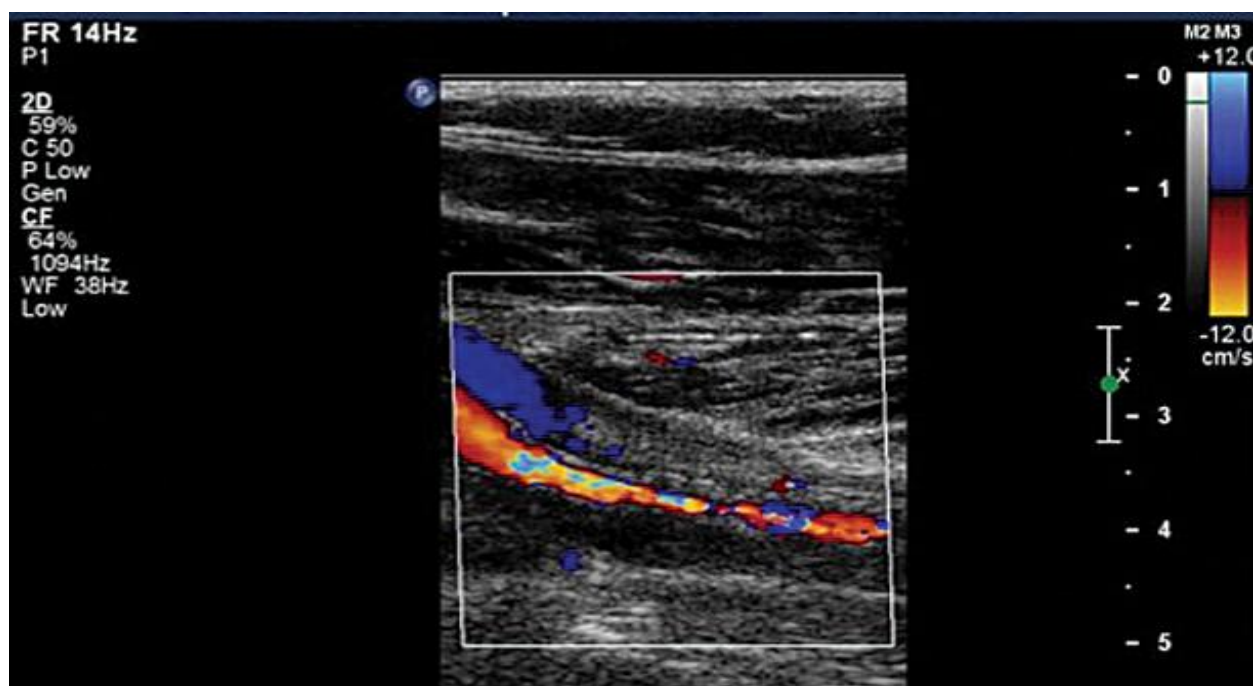


Εικόνα 2: Μέτρηση του σφυροβραχιονίου δείκτη, ο οποίος υπολογίζεται διαιρώντας τη συστολική αρτηριακή πίεση στον αστράγαλο με τη συστολική αρτηριακή πίεση στο βραχίονα [13].

Φυσιολογικά ο δείκτης αυτός είναι >1 . Η περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων ορίζεται ως $ABI < 0,9$. Η ευαισθησία και η ειδικότητα αυτού του δείκτη έχει υπολογιστεί περίπου 79% και 96% αντίστοιχα [14]. Η παρουσία πολλαπλών αποτιτανωμένων αθηρωματικών πλακών στα αγγεία των κάτω άκρων μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Αντίθετα η μέτρηση του σφυροβραχιονίου δείκτη μετά την άσκηση αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου.

Το έγχρωμο-δυναμικό υπερηχογράφημα αποτελεί μία μη επεμβατική εξέταση, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στη διερεύνηση της ΠΑΑΚΑ. Είναι καλά ανεκτή και δεν περιλαμβάνει τη χορήγηση σκιαγραφικού ή τη χρήση iontίζουσας ακτινοβολίας. Η ευαισθησία και ειδικότητά της στην εντόπιση στενώσεων $>50\%$ έχει βρεθεί να είναι 85-90% και $>95\%$ αντίστοιχα, τιμές οι οποίες προσεγγίζουν την διαγνωστική ακρίβεια της ψηφιακής αγγειογραφίας[15-17]. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η εξάρτηση της αποτελεσματικότητάς της από την εμπειρία του διαγνώστη, η

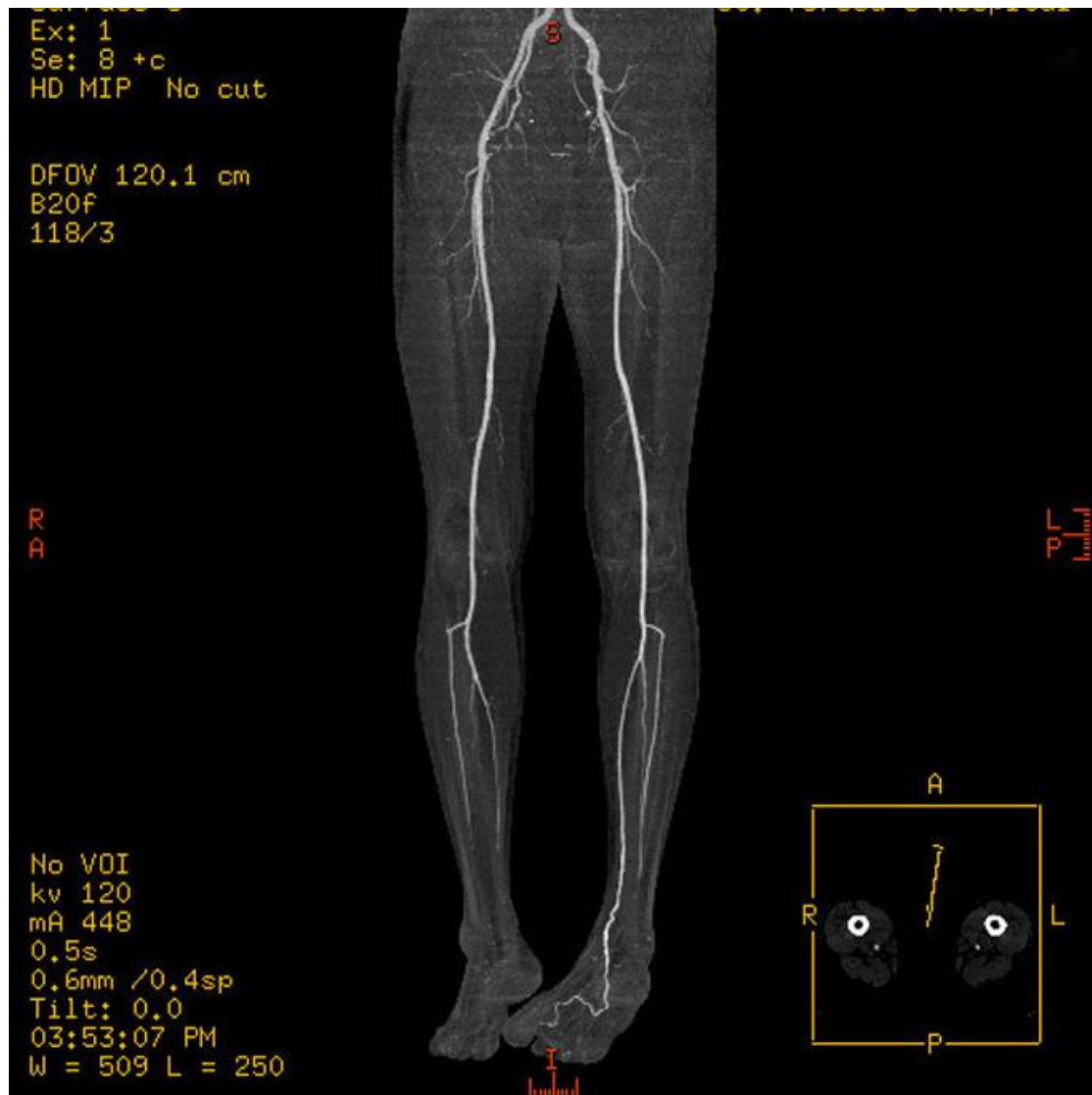
μειωμένη ακρίβεια στην περιοχή των λαγονίων αρτηριών, ιδίως σε παχύσαρκους ασθενείς και η παρεμπόδιση της ικανοποιητικής απεικόνισης των αγγείων από εκτεταμένες αθηρωματικές πλάκες.



Εικόνα 3: Αιμοδυναμικά σημαντική στένωση της επιπολής μηριαίας αρτηρίας, όπως αναδεικνύεται με τον έγχρωμο υπερηχογράφημα. Παρατηρείται εναλλαγή χρωμάτων στην περιοχή της στένωσης, λόγω αύξησης της ταχύτητας ροής (aliasing).

Η αξονική και η μαγνητική αγγειογραφία είναι δύο μέθοδοι με υψηλή διαγνωστική ακρίβεια. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της αξονικής αγγειογραφίας στην ανάδειξη στενώσεων >50% αγγίζουν το 96% και 98% αντίστοιχα στις λαγόνιες αρτηρίες και περιορίζονται σχετικά σε 95% και 91% στις αρτηρίες κάτωθεν του γόνατος[18]. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ευχερής και σαφής απεικόνιση των αποτιτανώσεων, των χειρουργικών ελασμάτων και των μεταλλικών ενδοπροθέσεων. Ο θόρυβος στην εικόνα που προκαλούν οι έντονες αποτιτανώσεις αποτελούν το βασικό περιορισμό. Η ευαισθησία και η

ειδικότητα της μαγνητικής αγγειογραφίας αγγίζουν αυτές της ψηφιακής αγγειογραφίας (αμφότερες 93-100%). Η χρήση της δεν είναι δυνατή σε ασθενείς με βηματοδότη ή κλειστοφοβικούς, ενώ πρόβλημα της μεθόδου αποτελεί και η μη ικανοποιητική απεικόνιση των αποτιτανώσεων.



Εικόνα 4: Αξονική αγγειογραφία των κάτω άκρων (MIP ανασύνθεση της εικόνας)

Η ψηφιακή αγγειογραφία αποτελεί την πλέον ενδεδειγμένη εξέταση για τη διερεύνηση της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων. Ιδίως οι εκλεκτικές εγχύσεις επιτρέπουν την λεπτομερέστατη απεικόνιση των στενώσεων ακόμα και στα περιφερικότερα τμήματα. Λόγω της βελτίωσης της διαγνωστικής ακρίβειας των λοιπών τεχνικών, η χρήση της περιορίζεται κυρίως στους ασθενείς, οι οποίοι πρόκειται να υποβληθούν σε κάποια επέμβαση, καθώς πρόκειται για μία επεμβατική μέθοδο με σπάνιες, αλλά πιθανές επιπλοκές.



Εικόνα 5: Ψηφιακή αγγειογραφία που αναδεικνύει αιμοδυναμικά σημαντική στένωση στη δεξιά κοινή λαγόνιο αρτηρία.

5. Συντηρητική Θεραπεία

Όλοι οι ασθενείς με περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων έχουν αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών επεισοδίων και ως εκ τούτου χρήζουν προφυλακτικής θεραπείας μέσω καταπολέμησης των παραγόντων κινδύνου. Αντίθετα θεραπείες επαναγγείωσης έχουν ένδειξη μόνο στους συμπτωματικούς ασθενείς.

Η δύο βασικοί άξονες στους οποίους βασίζεται η συντηρητική θεραπεία είναι η άσκηση και η φαρμακευτική αγωγή.

Αρκετές τυχαιοποιημένες μελέτες και μετα-αναλύσεις έχουν αποδείξει τα οφέλη της άσκησης[19-22]. Η άσκηση ιδίως όταν είναι εντατική και επιτηρούμενη, τουλάχιστον τους πρώτους 3 μήνες της θεραπείας αυξάνει σημαντικά την απόσταση που μπορεί να περπατήσει ο ασθενής πριν την έναρξη του άλγους. Τα συνοδά νοσήματα όπως καρδιολογικά η αναπνευστικά προβλήματα αλλά και ορθοπεδικά και νευρολογικά νοσήματα περιορίζουν την ικανότητα αρκετών από τους ασθενείς να ασκηθούν. Οι ασθενείς με περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια σταδίου IV κατά Fontaine δεν πρέπει να ασκούνται.

Όσον αφορά τη φαρμακευτική αγωγή εστιάζεται στα φάρμακα που αποσκοπούν στη μείωση της αθηρωμάτωσης , όπως τα αντιυπερτασικά, τα αντιλιπιδαιμικά και τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα. Τα ανωτέρω αποσκοπούν στη γενικότερη βελτίωση της πρόγνωσης αυτών των ασθενών, με μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων, ενώ τα αντιλιπιδαιμικά και αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, έχουν δείξει όφελος και στη βελτίωση της διαλείπουσας χλωλότητας[23]. Άλλα φάρμακα εστιάζουν περισσότερο στην καθαυτή αντιμετώπιση της διαλείπουσας χλωλότητας . Τα σημαντικότερα εξ αυτών, τα οποία έχουν δείξει στατιστικά σημαντικό όφελος σε τυχαιοποιημένες μελέτες είναι η

σιλοσταζόλη [23, 24], η ναφτιδροφουρίλη[25-27] και η πεντοξυφυλλίνη[23]. Η ναφτιδροφουρίλη είναι ανταγωνιστής της σεροτονίνης και δρα ως αγγειοδιασταλτικό, ενώ η σιλοσταζόλη και η πεντοξυφυλλίνη είναι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης που δρουν επίσης ως αγγειοδιασταλτικά.

6. Ενδοαγγειακή-Χειρουργική Θεραπεία

Η ενδοαγγειακές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια. Ο όρος ενδοαγγειακή θεραπεία περιλαμβάνει την αγγειοπλαστική με αεροθαλάμους και κατά περίπτωση τη χρήση μεταλλικών ενδοπροθέσεων. Νέες τεχνικές, όπως η υπενδοθηλιακή προσπέλαση αποφράξεων και νέα υλικά έχουν βελτιώσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Κατά συνέπεια οι ενδοαγγειακές τεχνικές αποτελούν μέθοδο εκλογής για την αρχική προσέγγιση των περισσότερων ασθενών, καθώς έχουν σαφώς μικρότερη νοσηρότητα και θνητότητα συγκριτικά με τις χειρουργικές μεθόδους. Οι χειρουργικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση της ΠΑΑΚΑ είναι τα διάφορα είδη παρακάμψεων, με τα οποία παρακάμπτεται το αποφραγμένο αγγείο και επαναιματώνονται χρησιμοποιώντας φλεβικά ή συνθετικά μοσχεύματα τα βατά αγγεία περιφερικά αυτού. Η ενδεικνυόμενη θεραπεία για κάθε ασθενή, πρέπει να αποφασίζεται από ομάδα πολλών ειδικοτήτων, λαμβάνοντας υπ' όψιν την ανατομική καταλληλότητα των αλλοιώσεων, τα συνοδά νοσήματα, καθώς και την εμπειρία των ιατρών του κέντρου σε κάθε τεχνική.

Το κυριότερο μειονέκτημα των ενδοαγγειακών τεχνικών συγκριτικά με τις χειρουργικές σχετίζεται με την μακροχρόνια βατότητα.

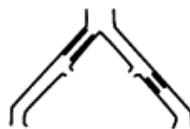
Η πρόγνωση όσον αφορά τη μακροχρόνια βατότητα είναι καλύτερη στις λαγόνιες αρτηρίες και δυσμενέστερη σε περιφερικές αλλοιώσεις. Δυσμενέστερη επίσης είναι η μακροχρόνια πρόγνωση σε στενώσεις μεγάλου μήκους, σε πολλαπλές διάχυτες στενώσεις, σε ανεπαρκή περιφερική ροή και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και νεφρική ανεπάρκεια. Τα νέα υλικά με μεταλλικές ενδοπροθέσεις και αεροθαλάμους που εκλύουν κυτταροστατικές ουσίες έχουν δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα, χωρίς ωστόσο να είναι δυνατόν να λύσουν πλήρως το πρόβλημα των επαναστενώσεων.

Η TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC II) έχει χωρίσει τις στενώσεις σε κάθε επίπεδο σε κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό της στένωσης ή την παρουσία απόφραξης, το σημείο της αλλοίωσης, την πολλαπλότητα των αλλοιώσεων και το μήκος τους. Σε κάθε επίπεδο υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες (A-D) και υπάρχουν και συστάσεις για την καταλληλότερη μέθοδο επαναγγείωσης. (Εικόνες 6,7)[1]. Σύμφωνα με αυτές τις οδηγίες η πλειοψηφία των ασθενών είναι προτιμότερο να αντιμετωπιστούν με ενδοαγγειακές μεθόδους.

Συγκεκριμένα οι αλλοιώσεις οι οποίες κατατάσσονται στην κατηγορία A χρήζουν ενδαγγειακής θεραπείας, ενώ οι αλλοιώσεις που ανήκουν στην κατηγορία D χρήζουν χειρουργικής θεραπείας. Στην κατηγορία B γενικά προτιμάται η ενδαγγειακή θεραπεία και στην κατηγορία C η χειρουργική θεραπεία, ωστόσο σε αυτές τις κατηγορίες πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν και άλλοι παράγοντες για την απόφαση, όπως οι συνοδές παθήσεις, η προτίμηση του ασθενούς και η εμπειρία της ιατρικής ομάδας που θα αναλάβει την επέμβαση[1]. Τέλος ο ακρωτηριασμός είναι η τελική λύση σε περιπτώσεις που η επαρκής επαναιμάτωση δεν μπορεί να επιτευχθεί με καμία μέθοδο.

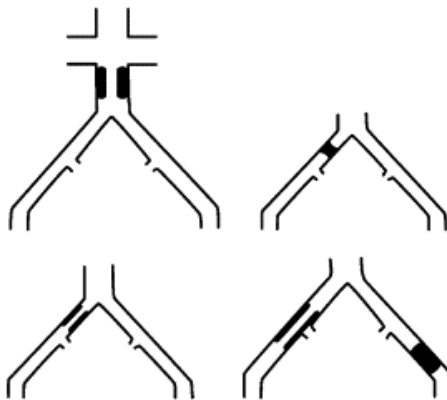
Type A lesions

- Unilateral or bilateral stenoses of CIA
- Unilateral or bilateral single short (≤ 3 cm) stenosis of EIA



Type B lesions:

- Short (≤ 3 cm) stenosis of infrarenal aorta
- Unilateral CIA occlusion
- Single or multiple stenosis totaling 3–10 cm involving the EIA not extending into the CFA
- Unilateral EIA occlusion not involving the origins of internal iliac or CFA



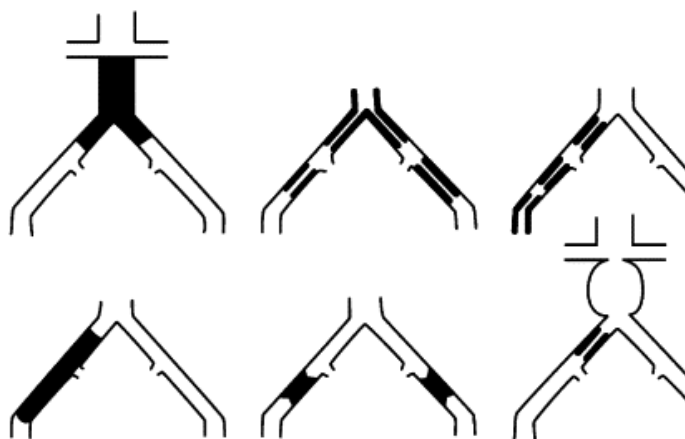
Type C lesions

- Bilateral CIA occlusions
- Bilateral EIA stenoses 3–10 cm long not extending into the CFA
- Unilateral EIA stenosis extending into the CFA
- Unilateral EIA occlusion that involves the origins of internal iliac and/or CFA
- Heavily calcified unilateral EIA occlusion with or without involvement of origins of internal iliac and/or CFA



Type D lesions

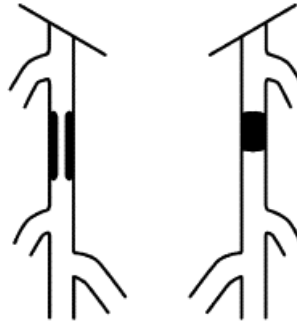
- Infra-renal aortoiliac occlusion
- Diffuse disease involving the aorta and both iliac arteries requiring treatment
- Diffuse multiple stenoses involving the unilateral CIA, EIA, and CFA
- Unilateral occlusions of both CIA and EIA
- Bilateral occlusions of EIA
- Iliac stenoses in patients with AAA requiring treatment and not amenable to endograft placement or other lesions requiring open aortic or iliac surgery



Εικόνα 6: Ταξινόμηση κατά TASC των αρτολαγόνιων αλλοιώσεων. CIA: κοινή λαγόνιος αρτηρία, EIA: Έξω λαγόνιος αρτηρία CFA: κοινή μηριαία αρτηρία, AAA: ανεύρυσμα κοιλιακή αρτηρίας[1].

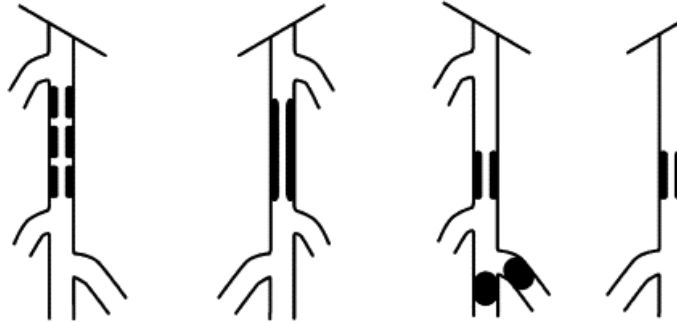
Type A lesions

- Single stenosis ≤ 10 cm in length
- Single occlusion ≤ 5 cm in length



Type B lesions:

- Multiple lesions (stenoses or occlusions), each ≤ 5 cm
- Single stenosis or occlusion ≤ 15 cm not involving the infrageniculate popliteal artery
- Single or multiple lesions in the absence of continuous tibial vessels to improve inflow for a distal bypass
- Heavily calcified occlusion ≤ 5 cm in length
- Single popliteal stenosis



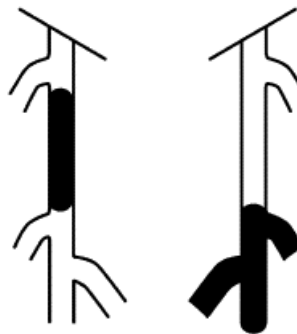
Type C lesions

- Multiple stenoses or occlusions totaling >15 cm with or without heavy calcification
- Recurrent stenoses or occlusions that need treatment after two endovascular interventions



Type D lesions

- Chronic total occlusions of CFA or SFA (>20 cm, involving the popliteal artery)
- Chronic total occlusion of popliteal artery and proximal trifurcation vessels



Εικόνα 7: Ταξινόμηση κατά TASC των αλλοιώσεων στη μηριαία και την ιγνυακή αρτηρία. CFA: κοινή μηριαία αρτηρία, SFA: επιπολής μηριαία αρτηρία[1].

7. Περιορισμοί των υπαρχουσών θεραπευτικών μεθόδων και μελλοντικές θεραπευτικές προοπτικές

Σε ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία, πολλές φορές όλες οι υπάρχουσες θεραπευτικές μέθοδοι είναι ανεπαρκείς. Ασθενείς με άλγος ηρεμίας ή ασθενείς με απώλεια ιστού εάν δεν υποβληθούν σε επέμβαση επαναγγείωσης και αντιμετωπιστούν μόνο συντηρητικά έχουν ποσοστό ακρωτηριασμού 73% και 95% αντίστοιχα μέσα σε 1 χρόνο. Το ποσοστό αυτό με την επέμβαση επαναγγείωσης μειώνεται σε 25% στην ομάδα ασθενών με απώλεια ιστού, ποσοστό ωστόσο που παραμένει αρκετά υψηλό[28]. Επιπλέον για να επιτευχθεί ένα τέτοιο ποσοστό διάσωσης του άκρου, απαιτούνται επανεπεμβάσεις μέσα σε 3 μήνες σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς[29]. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν την ανάγκη για νέες μεθόδους επαναγγείωσης, πλην της μηχανικής. Η θεραπευτική αγγειογένεση έχει να παρουσιάσει ορισμένα ενθαρρυντικά πρώτα αποτελέσματα και αποτελεί πεδίο εκτεταμένης έρευνας με στόχο να αποτελέσει τη μελλοντική θεραπεία της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων.

B. Διεργασίες δημιουργίας νέων αγγείων

Η δημιουργία νέων αγγείων μπορεί να χωριστεί σε τρεις διακριτές διαδικασίες: Την ενδοθηλιογένεση (vasculogenesis), την αγγειογένεση (angiogenesis) και την αρτηριογένεση (arteriogenesis).

Ενδοθηλιογένεση	Η διαδικασία που αφορά την δημιουργία πλήρως αναπτυγμένων αγγείων κατά την εμβρυϊκή ζωή (αβέβαιος ο ρόλος της στην ενήλικη ζωή)
Αγγειογένεση	Η διαδικασία της ανάπτυξης νέων αγγείων τα οποία δεν έχουν μέσο χιτώνα. Αυτά τα αγγεία είναι πολύ μικρά, αλλά σημαντικά στην επούλωση πληγών.
Αρτηριογένεση	Η διαδικασία του σχηματισμού νέων αρτηριών, με πλήρως ανεπτυγμένο μέσο χιτώνα, μέσω της ωρίμανσης προϋπαρχόντων παράπλευρων αγγείων ή μέσω της de novo δημιουργίας ώριμων αγγείων. Αυτά τα αγγεία είναι συνήθως μεγάλα και αποτελούν ένα είδος αυτόλογης αρτηριακής παράκαμψης (by-pass).

Πίνακας 2: Ορισμοί των διαφόρων διαδικασιών δημιουργίας νέων αγγείων[30]

1. Ενδοθηλιογένεση

Η ενδοθηλιογένεση αφορά την διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (endothelial progenitor cells – EPCs) και την άθροιση σε νησίδια, τα οποία ενώνονται και σχηματίζουν τα αρχέγονα δίκτυα τριχοειδών[31]. Τα αρχέγονα αυτά δίκτυα στη συνέχεια αναπτύσσονται μέσω της αγγειογένεσης, εισέρχονται σε διάφορους ιστούς-στόχους και σχηματίζουν το πρώιμο αγγειακό δίκτυο

των οργάνων του εμβρύου. Ορισμένα από τα δίκτυα αυτά παραμένουν τριχοειδή, ενώ κάποια άλλα διαφοροποιούνται σε αρτηρίες και φλέβες[32].

Μέχρι πρόσφατα η ενδοθηλιογένεση θεωρούταν ότι περιορίζεται στην εμβρυϊκή ζωή και η αγγειογένεση είναι υπεύθυνη αποκλειστικά για την νεοαγγείωση στη μεταεμβρυϊκή ζωή. Η εύρεση προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων, θετικών στον υποδοχέα CD-34, στην περιφερική αιματική κυκλοφορία, τα οποία μεταναστεύουν στις περιοχές νεοαγγείωσης στον ενήλικα, κατέρριψε αυτή τη θεωρία[33, 34]. Αργότερα έρευνες έδειξαν ότι τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνουν σε αριθμό ως απάντηση στην ισχαιμία δημιουργώντας νέες ομάδες τριχοειδών δείχνοντας ότι η δημιουργία νέων αγγείων στη μετεμβρυϊκή ζωή δεν περιορίζεται στην αγγειογένεση αλλά εμπεριέχει και ενδοθηλιογένεση[35].

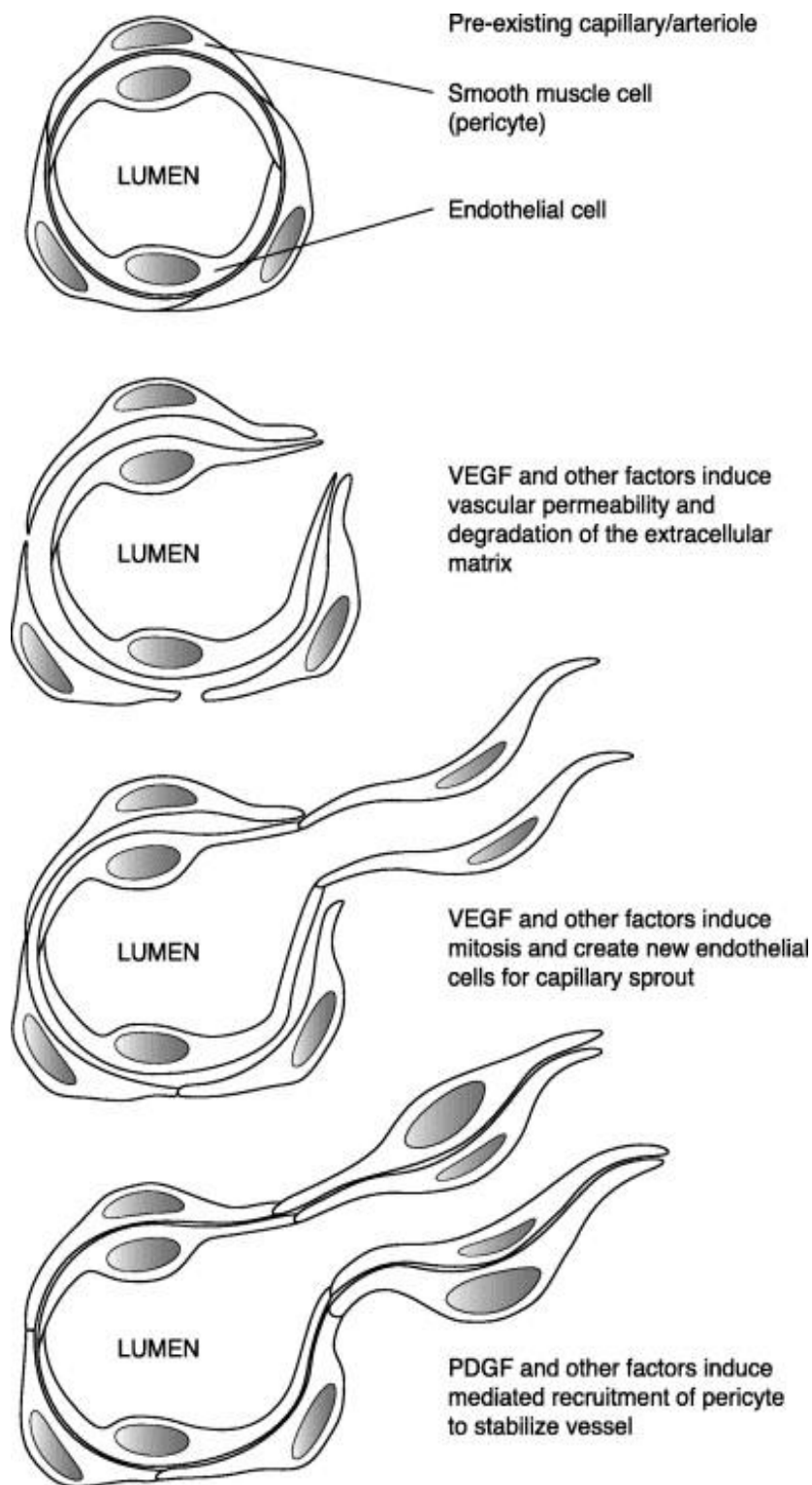
2. Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων μέσω του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης υπαρχόντων πλήρως διαφοροποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά αυτά κύτταρα ενώνονται με τα υπάρχοντα αγγεία μετά από ερεθίσματα όπως η υποξία, ο μηχανικός τραυματισμός και η φλεγμονή[32, 36]. Η αγγειογένεση μπορεί να αποτελεί μία φυσιολογική ή μία παθολογική διαδικασία. Παραδείγματα φυσιολογικής αγγειογένεσης είναι η επούλωση των πληγών και ο καταμήνιος κύκλος της γυναίκας και παθολογικής αγγειογένεσης είναι η ανάπτυξη των όγκων, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια[37-40].

Η αγγειογένεση είναι ένα σύνθετο πολυπαραγοντικό φαινόμενο, που χωρίζεται σε αρκετές διακριτές διεργασίες. Αυτές περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, την εξωκυττάρια πρωτεόλυση, την ενδοθηλιακή διαφοροποίηση (σχηματισμός τριχοειδών) και ανασύσταση του αγγειακού τοιχώματος. Είναι πολύ σημαντικό να επισημανθεί ότι αυτά τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία στερούνται λείων μυϊκών κυττάρων και ως εκ τούτου είναι επιρρεπή σε τραυματισμούς, ευάλωτα σε υποξική βλάβη και δεν έχουν την ικανότητα να αναδιατάσσονται. Εν ολίγοις δεν μπορούν να διατηρήσουν επαρκή κυκλοφορία και να προσαρμόζονται στις αλλαγές που επέρχονται στις ανάγκες ζήτησης αιματικής παροχής [37-40].

Τα προϋπάρχοντα τριχοειδή στην περιοχή της ισχαιμίας εκκινούν τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Το πρώτο βήμα είναι η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από μια ποικιλία αγγειακών αυξητικών παραγόντων. Η ομάδα πρωτεϊνών του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor-VEGF) είναι πιθανότατα η πιο σημαντική για την αγγειογένεση. Σε διάφορα πειραματικά μοντέλα σε πειραματόζωα, μια μεγάλη ποσότητα VEGF έχει βρεθεί ότι απελευθερώνεται μετά από ισχαιμική βλάβη μυός. Η υποξία είναι ένα από τα ισχυρότερα ερεθίσματα, η οποία δρα προκαλώντας τη σύνδεση του παράγοντα HIF-1α (Hypoxia-inducible factor 1α) με το HRE (Hypoxia response element) στον υποκινητή (promoter) του γονιδίου του VEGF[41]. Το ισχαιμικό περιβάλλον ενεργοποιεί επίσης τη σύνθεση του VEGF από μονοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα και αιμοπετάλια του περιφερικού αίματος[42]. Η ταυτόχρονη αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, επαγόμενη

από τον VEGF με την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας από μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι κρίσιμα βήματα για να δημιουργηθεί το κατάλληλο περιβάλλον για την αγγειογένεση. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται χώρος για να πολλαπλασιαστούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και να εισέρθουν στην περιοχή τα φλεγμονώδη κύτταρα και να δημιουργηθούν νέα τριχοειδή. Η εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος και φλεγμονωδών κυττάρων, η οποία προκαλείται από τον VEGF παρέχει επιπλέον κυτοκίνες άλλες ουσίες που προάγουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων [43]. Όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα φτάσουν στην εξωκυττάρια ουσία σχηματίζουν γραμμοειδείς σχηματισμούς και στη συνέχεια αυλό. Αυτό επιτυγχάνεται με λέπτυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συνένωση με τα υπάρχοντα αγγεία. Διάφορες αγγειοπρωτεΐνες, ιντεγκρίνες και ο VEGF ρυθμίζουν τη διάμετρο των αγγείων. Ο TGF- β (Transforming growth factor) και ο PDGF (Platelet derived growth factor) ενεργοποιούν την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και προσελκύουν περικύτταρα για να σταθεροποιήσουν τα νέα αγγεία[44]. (Εικόνα 8)



VEGF- Vascular Endothelial Growth Factor
PDGF- Platelet-Derived Growth Factor

Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών σταδίων της αγγειογένεσης[30].

A. Απεικονίζεται το προϋπάρχον τριχοειδές/αρτηρίδιο, το οποίο αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα.

B. Ο VEGF και άλλοι αυξητικοί παράγοντες αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα και την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας.

Γ. Ο VEGF και άλλοι αυξητικοί παράγοντες προκαλούν τη μίτωση και τον σχηματισμό νέων ενδοθηλιακών κυττάρων.

Δ. Ο PDGF και άλλοι αυξητικοί παράγοντες προσελκύουν περικύτταρα, ώστε να σταθεροποιηθεί το αγγείο.

Μία πληθώρα από αυξητικούς παράγοντες έχουν αναγνωρισθεί ως υπεύθυνοι για τη φυσιολογική όσο και την παθολογική

αγγειογένεση. Αυτές οι ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί ερευνητικά στην επαγωγή της δημιουργίας παράπλευρων αγγείων σε πειραματόζωα , αλλά και ασθενείς[45-47].

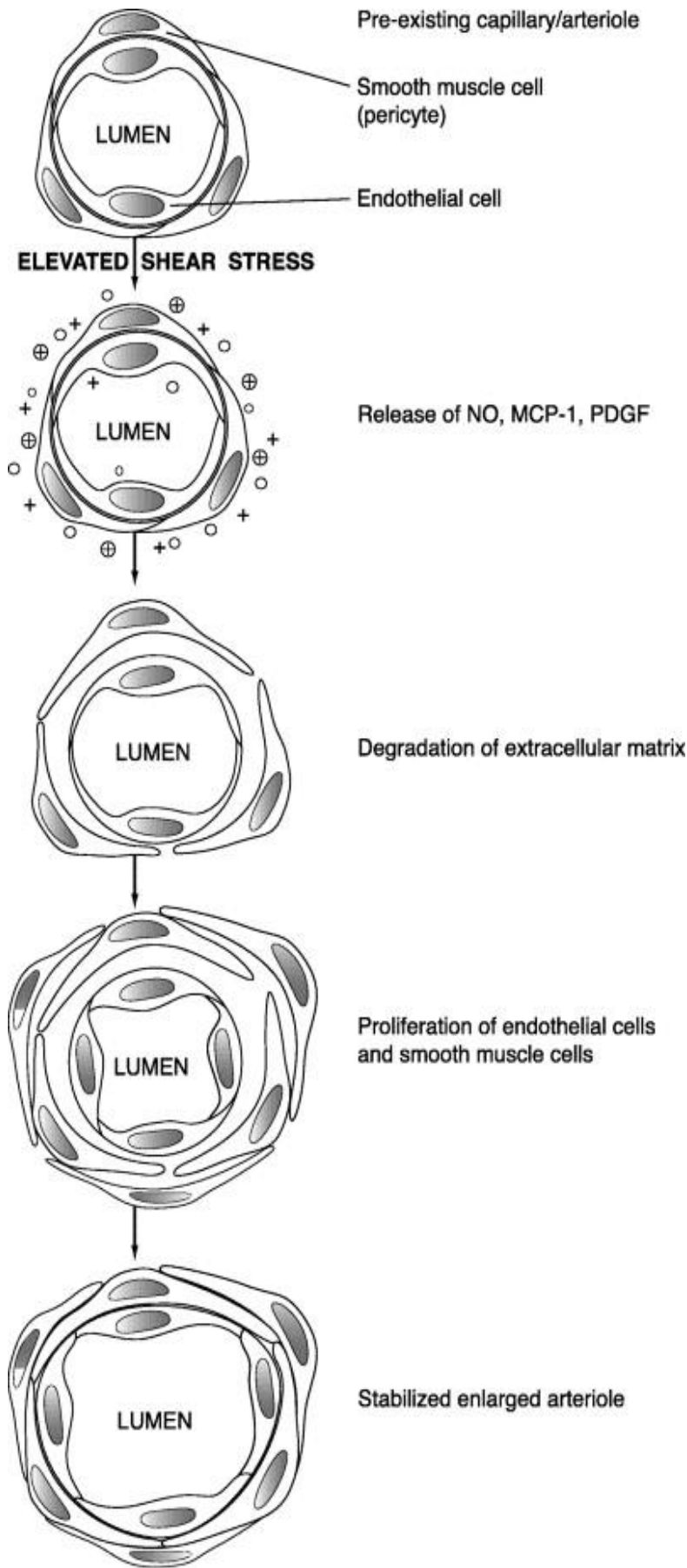
3. Αρτηριογένεση

Είναι σαφής η σημασία της δημιουργίας μεγάλων παράπλευρων αρτηριών για την αντιμετώπιση της ιστικής ισχαιμίας, όπως επίσης και το γεγονός ότι οι μηχανισμοί που οδηγούν στη δημιουργία αυτών των αγγείων διαφέρουν από τους μηχανισμούς της ενδοθηλιογένεσης και αγγειογένεσης [48]. Η οξεία απόφραξη μεγάλων ή μεσαίου μεγέθους αρτηριών έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση προϋπάρχουσων λανθανουσών μη λειτουργικών συνδέσεων ανάμεσα σε αρτηριόλια. Τα παράπλευρα αγγεία μπορούν να ωριμάσουν σε μεγάλες αρτηρίες, οι οποίες αποκαθιστούν επαρκώς την κυκλοφορία στις ισχαιμικές περιοχές. Η ανάπτυξη των αγγείων αυτών μπορεί να χρειαστεί ωστόσο αρκετές ημέρες ή εβδομάδες για να αντιρροπίσει μία σοβαρή στένωση. Φαίνεται ότι γενετικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την ποικιλία στις προϋπάρχουσες συνδέσεις και την ικανότητα αυτών να αντιρροπίσουν την ισχαιμία[49]. Είναι σημαντικό να διασαφηνιστεί ότι αυτή η διαδικασία δεν είναι μια παθητική αγγειοδιαστολή, αλλά ένας ενεργός πολλαπλασιασμός και ανακατανομή κυττάρων, η οποία απαιτεί πολλαπλά βήματα και ενεργοποίηση και αλληλεπίδραση πολλών τύπων κυττάρων.

Σε αντίθεση με την αγγειογένεση, η υποξία δεν είναι το βασικό ερέθισμα για την αρτηριογένεση[50]. Ένα βασικό ερέθισμα για την αρτηριογένεση αποτελούν οι δυνάμεις που τείνουν να διασπάσουν το τοίχωμα της αρτηρίας και οι οποίες προκαλούν ενεργοποίηση των

ενδοθηλιακών κυττάρων και φλεγμονώδεις αλλαγές στη νεοσχηματιζόμενη αρτηρία[51]. Οι αυξημένες δυνάμεις τάσης έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση μιας σειράς γονιδίων εν μέρει μέσω μιας πρωτεΐνης που συνδέεται με το SSRE (shear stress responsive element), το οποίο είναι παρόν στις περιοχές επαγωγής πολλών εξ αυτών. Τα μόρια προσκόλλησης αυξάνονται επίσης σε αριθμό, επιτρέποντας την προσκόλληση και διείσδυση μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων, τα οποία μπορούν με τη σειρά τους να παράγουν αυξητικούς παράγοντες[52].

Μετά την προσκόλληση και διείσδυση των μονοκυττάρων και των αιμοπεταλίων επακολουθεί το πρώτο κύμα μίτωσης των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων. Σε αυτό το σημείο τα λεία μυϊκά κύτταρα αλλάζουν φαινότυπο. Μετατρέπονται από το φαινότυπο που τους δίνει δυνατότητα σύσπασης, στον φαινότυπο που τους δίνει δυνατότητα πολλαπλασιασμού. Αυτή η αλλαγή παίζει καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία νέου χιτώνα (neointima). Η εισβολή των μονοκυττάρων είναι πιο έντονη στον έσω χιτώνα, κατά την αρχική είσοδο, αλλά ακόμα πιο εξεσημασμένη στη συνέχεια στον έξω χιτώνα, όπου δημιουργείται ένα φλεγμονώδες περιβάλλον, στο οποίο αργότερα προστίθενται και T- λεμφοκύτταρα. Ένα από τα αποτελέσματα της περιαγγειακής φλεγμονής είναι ότι δημιουργεί το χώρο για τα παράπλευρα αγγεία, τα οποία μπορούν να αυξηθούν σε μέγεθος έως και κατά 20 φορές. Ο χώρος αυτός δημιουργείται εξαναγκάζοντας τα γειτονικά κύτταρα σε απόπτωση. Μόλις το νέο αγγείο δημιουργηθεί τα λεία μυϊκά κύτταρά του επανέρχονται στο φαινότυπο που έχει δυνατότητα να συσπάται[53].



NO- Nitric Oxide
MCP-1- Monocyte Chemoattractant Protein 1
PDGF- Platelet-Derived Growth Factor

Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών σταδίων της αρτηριογένεσης[30].

A. Απεικονίζεται το προϋπάρχον τριχοειδές/αρτηριόλιο, το οποίο αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα.

B. Απελευθέρωση NO (μονοξειδίου του αζώτου), MCP-1 (Πρωτεΐνη που προσελκύει τα μονοκύτταρα) και PDGF (Αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια)

Γ. Αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας

Δ. Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων.

E. Σταθεροποίηση του αυξημένου σε μέγεθος αρτηριολίου

Γ. Θεραπευτική αγγειογένεση

Πολλές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειραματικά μοντέλα για την επαγωγή της αγγειογένεσης με θετικά αποτελέσματα , χωρίς ωστόσο να επιτευχθούν έως τώρα ανάλογα αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές. Οι αυξητικοί παράγοντες που έχουν προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF), ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF), ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (PLGF), ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) και ο αναπτυξιακός τοπικός ενδοθηλιακός (Del-1). Γονίδια και κύτταρα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για αυτόν το σκοπό. Ακολουθεί μία συνοπτική παρουσίαση των παραγόντων που έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπευτική αγγειογένεση[54]. Παρουσιάζεται αναλυτικά ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) και συγκεκριμένα η δομή, η λειτουργία του και ο ρόλος του έως σήμερα στην αγγειογένεση, καθώς αυτή είναι η ουσία που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας. Στη συνέχεια θα αναφερθεί ο ρόλος της θρομβίνης στην αγγειογένεση, η οποία χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό μας πρωτόκολλο ως θετικός μάρτυρας. Τέλος θα αναπτυχθεί ο ρόλος των καλύτερα μελετημένων ουσιών στη θεραπευτική αγγειογένεση.

1. Νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF)

i. Ιστορική αναδρομή-Γενικές πληροφορίες

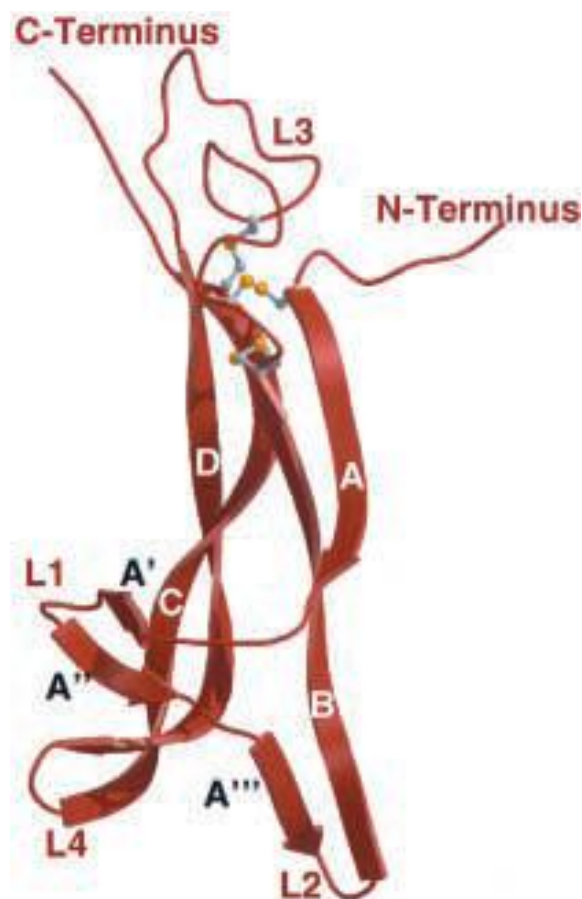
Ο νευρικός αυξητικός παράγοντας ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1950 από την ερευνητική ομάδα της Rita Levi Montalcini. Αρχικά βρέθηκε η δυνατότητά του να ρυθμίζει την αύξηση, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των περιφερικών νευρώνων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. [55]. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι επιδράσεις του

στα νευρικά κύτταρα του περιφερικού και του κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς και σε αρκετά μη νευρικά κύτταρα [56, 57]. Εκτός από τις καλά μελετημένες δράσεις του στην επιβίωση και τη διαφοροποίηση των νευρώνων, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι ο NGF μπορεί να προκαλέσει μία ποικιλία επιδράσεων στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [58]. Ο NGF θεωρείται πλέον ότι είναι ένα μόριο που εμπλέκεται σε ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών, όπως επούλωση πληγών και σχηματισμό ουλώδους ιστού [59-61].

Οι βιολογικές δράσεις του NGF εξαρτώνται άμεσα από τη δέσμευσή του σε συγκεκριμένους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων: τους υποδοχείς TrkA και p75 [62]. Ο TrkA είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης μοριακού βάρους 140 kDa, η οποία είναι ο ειδικός υποδοχέας για τον NGF και φωσφορυλιώνεται αφού δεσμευτεί με τον NGF [63]. Ο p75 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, βάρους 75 kDa, μέλος της μεγάλης οικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor-TNF) [64, 65] με πλειοτροπική δράση, επειδή μπορεί να συνδέεται με χαμηλή συνάφεια, όχι μόνο με τον NGF, αλλά και με τις άλλες νευροτροπίνες [64, 66]. Σχετικά με τον βιολογικό ρόλο των δύο υποδοχέων του NGF αυτός είναι σαφής μόνο όσον αφορά την σχέση του TrkA, με τις διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στι δράσεις του περιλαμβάνονται ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η αναστολή της απόπτωσης και η αύξηση της αντίστασης στο stress [64]. Η παρουσία υποδοχέων τόσο TrkA, όσο και p75 σε μη νευρικούς ιστούς [56, 57] δείχνει ότι η επιρροή του NGF δεν περιορίζεται στο νευρικό σύστημα.

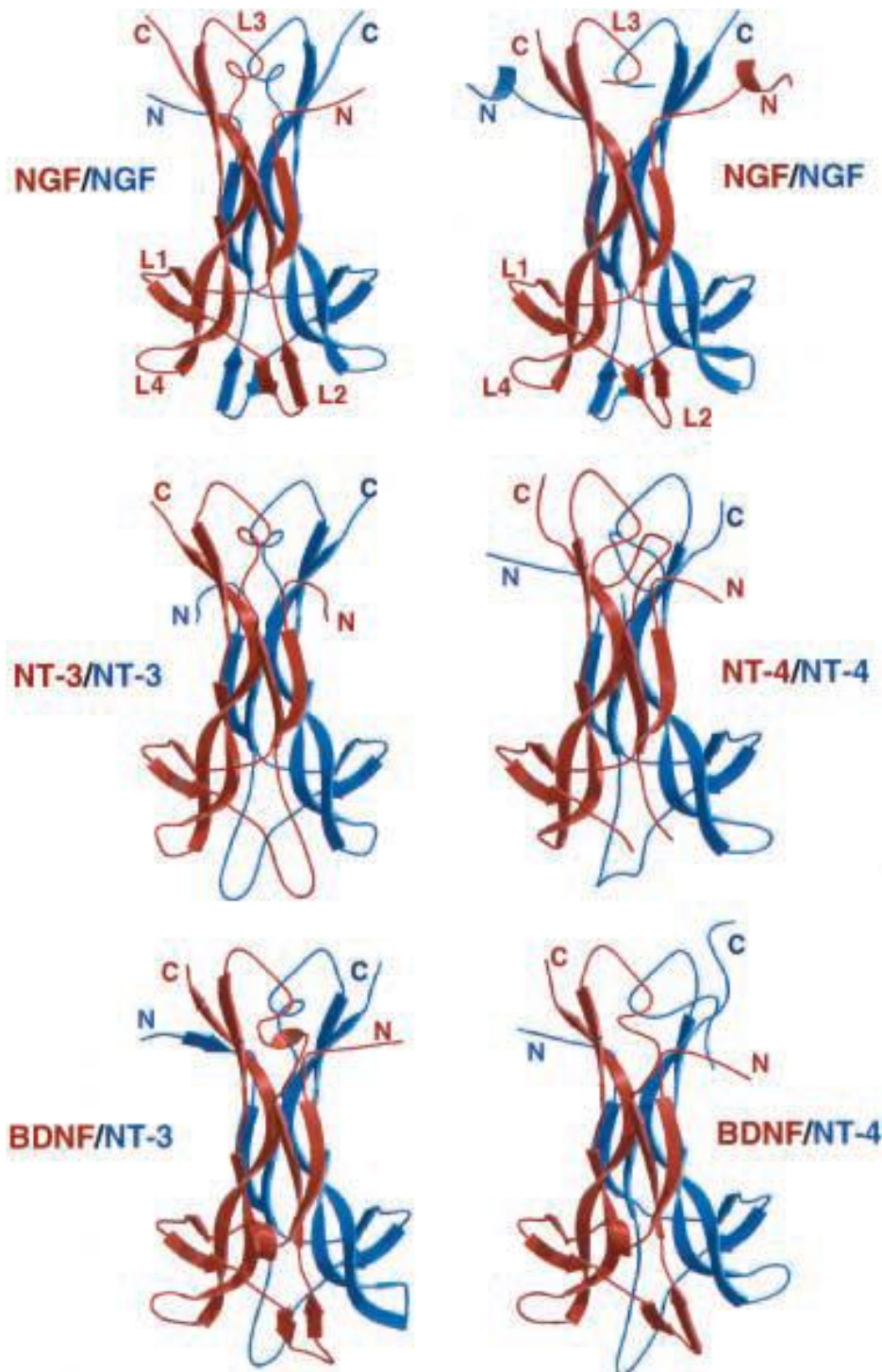
ii. Δομή του NGF

Όταν η δομή του NGF καθορίστηκε με X-ray κρυσταλλογραφία το 1991[67], έδειξε ένα νέο τρόπο πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, ο οποίος δεν είχε παρατηρηθεί μέχρι τότε σε άλλες ουσίες (Εικόνα 10). Η δομή που αποκαλύφθηκε έδειχνε ότι το μονομερές του NGF έχει ένα επίμηκες σχήμα με το κεντρικό τμήμα του μορίου να σχηματίζεται από δύο ζεύγη περιελιγμένων αντιπαράλληλων β-αλυσίδων. Υπάρχουν τρεις αγκύλες στο ένα άκρο, ενώ στο άλλο άκρο υπάρχει ένας «κόμπος» κυστεΐνης ο οποίος σταθεροποιεί την περιέλιξη της πρωτεΐνης και ακινητοποιεί τα μόρια στην μορφή που έχουν σχηματίσει.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του μονομερούς του NGF[68]. Οι τελικές περιοχές και οι αγκύλες L1-L4 απεικονίζονται κόκκινες. Τα αμινοξέα κυστεΐνης που σχηματίζουν τον κυστεϊνικό κόμπο στην κορυφή του μορίου απεικονίζονται με κίτρινες και γκρι μπάλες και ράβδους.

Στη βιολογικά ενεργή μορφή τους τα δύο μονομερή διατάσσονται παράλληλα έτσι ώστε να σχηματίζουν ένα στενά πακεταρισμένο ομοδιμερές (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Απεικόνιση των πειραματικά καθορισμένων διμερών των νευροτροπινών. Όλα τα N και C άκρα απεικονίζονται ονοματισμένα. Τα μη ονοματισμένα άκρα του τόξου αποτελούνται από τμήματα της κρυσταλλικής δομής τα οποία δεν βρίσκονται σε σειρά. Σε όλες τις περιπτώσεις τα μονομερή διμερίζονται με παράλληλο τρόπο, έτσι ώστε να τοποθετούνται τα N και C τελικά τμήματα στο ίδιο άκρο του μορίου. Οι αγκύλες οι οποίες είναι σημαντικές για την πρόσδεση του

p75 (L1,L3,L4), ή είναι ειδικές για τον Trk (L2, L4) διακρίνονται στην εικόνα. Στην πάνω σειρά απεικονίζεται το διμερές του NGF (αριστερά μη προσδεδεδεμένος NGF, δεξιά NGF σε σύμπλεγμα με τον TrkA υποδοχέα). Στη μεσαία γραμμή απεικονίζονται τα διμερή του NT-3 (αριστερά PDB access code 1NT-3) και NT-4 (δεξιά PDB access code 1B98). Στην κατώτερη σειρά απεικονίζονται ετεροδιμερή ανάμεσα στον BDNF (απεικονίζεται κόκκινος) και τον NT-3 (αριστερά PDB access code 1BND) και ανάμεσα στον BDNF (απεικονίζεται κόκκινος) και τον NT-4 (δεξιά PDB access code 1B8M). [68]

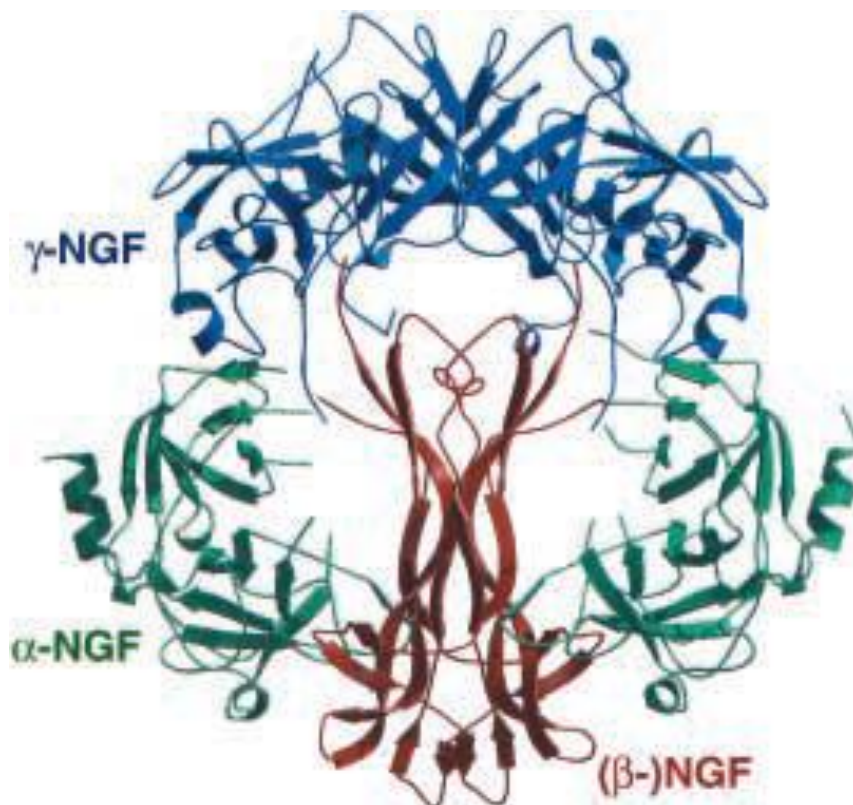
Το μοτίβο του κυστεϊνικού κόμπου, το οποίο παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στον NGF, αποτελείται από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι δύο από αυτούς, μαζί με το σκελετό της πρωτεΐνης που συνδέεται με τις κυστεΐνες σχηματίζουν έναν κλειστό δακτύλιο ο οποίος διαπερνάται από την τρίτη δισουλφιδική γέφυρα. Αυτό είναι ένα πολύ σταθερό μοτίβο, το οποίο έκτοτε έχει βρεθεί στη δομή πολλών διμερών αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι δεν έχουν άλλες ομοιότητες με τις νευροτροφίνες. Τέσσερις οικογένειες έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα οι οποίες είναι ο NGF, ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF), ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β) και η ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτά τα μόρια μοιράζονται μία παρόμοια δομή, η οποία αποτελείται από δύο ζεύγη διπλών β- αλυσίδων στο κέντρο, με το μοτίβο του κόμπου κυστεΐνης στο ένα άκρο και αγκύλες διαφόρων μηκών στο άλλο. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα που διαχωρίζει αυτές τις τέσσερις οικογένειες είναι ο τρόπος διμερισμού τους. Σε αντίθεση με τις άλλες οικογένειες ο NGF, όπως και οι υπόλοιπες νευροτροφίνες, σχηματίζει παράλληλα διμερή με αμφότερα τα μονομερή κατασκευασμένα γύρω από έναν κεντρικό διπλό άξονα. Ο μακρός άξονας των διμερών

συμπίπτει με το διπλό άξονα, δίνοντας έτσι στον NGF ένα σχήμα το οποίο μοιάζει με καμπάνα[68].

iii. Σύμπλεγμα 7SNGF

Ο NGF μπορεί να απομονωθεί σε μεγάλες ποσότητες από τον υπογνάθιο σιελογόνο αδένα ποντικών[69], όπου βρίσκεται συνδεδεμένος με τον α-NGF και τον γ-NGF, δύο πρωτεάσες σερίνης της οικογένειας της καλλικρεΐνης (σε αυτό το σύμπλεγμα ο καθαρός NGF ονομάζεται β-NGF). Ο NGF εκφράζεται με τη μορφή ενός προπεπτίδιου, το οποίο περιέχει ένα πεπτίδιο σηματοδότη που αποτελείται από 18 αμινοξέα, καθώς και από ένα προπεπτίδιο που αποτελείται από άλλα 103 αμινοξέα. Αν και ο γ-NGF είναι μία υψηλής ειδικότητας ενεργή πρωτεάση, η οποία είναι ικανή να οδηγήσει τον προ-NGF στην ώριμη μορφή του[70, 71], ο α-NGF είναι ανενεργός. Η κρυσταλλική μορφή του εν λόγω συμπλέγματος έχει αναλυθεί[72]. Το σύμπλεγμα περιέχει δύο αντίγραφα κάθε συστατικού δημιουργώντας έτσι μία α₂, β₂, γ₂ στοιχειομετρία, συμμετρικά διατεταγμένα γύρω από ένα διπλό συμμετρικό άξονα που σχετίζεται με δύο μόρια NGF (Εικόνα 12). Το σύμπλεγμα σταθεροποιείται από δύο ιόντα ψευδαργύρου τα οποία συνδέονται στα σημεία ένωσης ανάμεσα στον NGF και τον γ-NGF. Το διμερές του NGF βρίσκεται σε επαφή με αμφότερα τα αντίγραφα των μορίων του α-NGF και γ-NGF[73]. Τα α-NGF μόρια συνδέονται με το κεντρικό τμήμα του NGF εν μέρει επικαλύπτοντας το σημείο πρόσδεσης του υποδοχέα Trk. Αυτή η επικάλυψη είναι μικρότερη όσον αφορά τον α-NGF από ότι τον γ-NGF. Η επαφή του γ-NGF περιλαμβάνει αμινοξέα στην κορυφή του διμερούς του NGF εμπεριέχοντας την αγκύλη L3 και έναν αριθμό αμινοξέων από το άκρο C. Είναι ενδιαφέρον ότι το C άκρο του NGF είναι προσδεμένο με το ενεργό τμήμα της πρωτεάσης. Αν και

δεν υπάρχει επαφή ανάμεσα στα δύο μόρια του α -NGF, τα δύο μόρια του γ -NGF έχουν εκτεταμένη επαφή το ένα με το άλλο. Αυτή η επαφή συνεισφέρει στη συνολική σταθερότητα του συμπλέγματος. Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση δεν είναι επαρκής για να σταθεροποιήσει τα διμερή του γ -NGF σε απουσία του NGF και έτσι ο ελεύθερος γ -NGF είναι μονομερής σε διάλυμα[73].



Εικόνα 12: Διάγραμμα που δείχνει τη δομή του συμπλέγματος 7S NGF[68]. Τα διμερή του β -NGF απεικονίζονται κόκκινα στο κέντρο, δύο αντίγραφα του α -NGF απεικονίζονται με πράσινο χρώμα και δύο αντίγραφα του γ -NGF με μπλε χρώμα. Τα σημεία σύνδεσης του Trk και του p75NTR καλύπτονται εν μέρει από τις αλυσίδες α - και γ -.

iv. Υποδοχείς Trk

Οι υποδοχείς των νευροτροφινών TrkA, TrkB και TrkC μοιράζονται κοινή αρχιτεκτονική. Το εξωκυττάριο τμήμα τους αποτελείται από ένα

πλούσιο σε κυστεΐνη σύμπλεγμα (τμήμα 1), τρεις επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (τμήμα 2), ένα δεύτερο σύμπλεγμα πλούσιο σε κυστεΐνη (τμήμα 3) και δύο περιοχές που η δομή τους μοιάζει με ανοσοσφαιρίνες (Ig) (τμήματα 4 και 5)[74]. Το εξωκυττάριο τμήμα συνδέεται με μία μονή διαμεμβρανική έλικα με το ενδοκυττάριο τμήμα τυροσινικής κινάσης. Οι περιοχές των κινασών είναι ομόλογες με ταυτόσημες ακολουθίες σε περισσότερο από 75% της δομής τους, ενώ αντίθετα τα εξωκυττάρια τμήματα είναι πιο ετερογενή και οι ομοιότητες σε ακολουθίες φτάνουν μόνο το 50-55%[75]. Το πιο καλά διατηρημένο τμήμα από τις εξωκυττάρια περιοχές των τριών υποδοχέων είναι ένα μέρος του τμήματος 5 με εννέα από τα έντεκα αμινοξέα να είναι ταυτόσημα ανάμεσα στους τρεις Trk υποδοχείς. Η κρυσταλλική δομή αυτού του τμήματος, των TrkA, TrkB και TrkC υποδοχέων δείχνει ότι αυτό το τμήμα περιλαμβάνει την αγκύλη EF και καθορίζει τη δομή του συμπλέγματος ανάμεσα στον NGF και το τμήμα 5 του TrkA, η οποία καθορίζει τη λειτουργία αυτών των τμημάτων. Ο βιολογικός ρόλος άλλων τμημάτων, ιδίως του τμήματος 4, είναι λιγότερο καλά κατανοητός. Ένας αριθμός μελετών δείχνει ότι η παρουσία του τμήματος 4 απαιτείται για την επαρκή έκφραση και κατάλληλη αναδίπλωση του τμήματος στο οποίο δεσμεύεται ο συνδέτης, δηλαδή του τμήματος 5, τουλάχιστον *in vitro* [76, 77]. Ο ακριβής ρόλος των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών πλούσιων σε λευκίνη (τμήματα 2) είναι ακόμα αμφισβητούμενος.

v. Επίδραση του NGF στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*.

Ο NGF έχει αποδειχθεί ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων από ανθρώπινη ομφαλική φλέβα (HUVECs)

[78], σε ανθρώπινα χοριοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα [79], σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών [80] και σε ενδοθηλιακά κύτταρα από εγκέφαλο ποντικών [81]. Η έκφραση τόσο του TrkA, όσο και του p75 σε HUVECs αποδείχθηκε με RT-PCR ανάλυση και Western blotting [78]. Επιπλέον ο NGF προκάλεσε ταχεία φωσφορυλίωση του TrkA, η οποία αποφεύχθηκε με τον εκλεκτικό αναστολέα k252a. Επίσης, η έκφραση του NGF αυξάνεται σε HUVECs από τα οποία έχει αφαιρεθεί το πλάσμα, υποδηλώνοντας ότι η αύξηση της έκφρασης του NGF πιθανώς είναι μέρος της απάντησης των ενδοθηλιακών κυττάρων σε στέρηση τροφικών ουσιών [78]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικών και χοίρων παράγουν NGF και εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς του NGF, τον TrkA και τον p75. Ο εξωγενώς χορηγημένος NGF προκαλεί ταχεία φωσφορυλίωση του TrkA σε ενδοθηλιακά κύτταρα από την αορτή χοίρων και μετανάστευση αυτών [82, 83]. Ο NGF ενεργοποιεί δύο σημαντικά ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τον Ras/ERK και τον PI3K/Akt, τα οποία αμφότερα εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης και είναι απαραίτητοι για την επαγωγή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων [83].

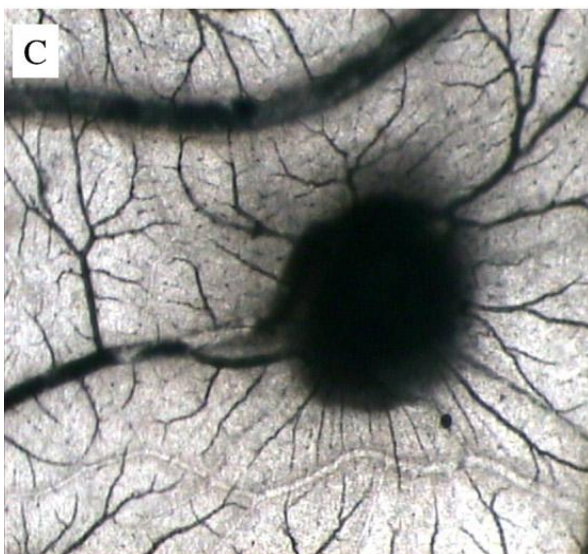
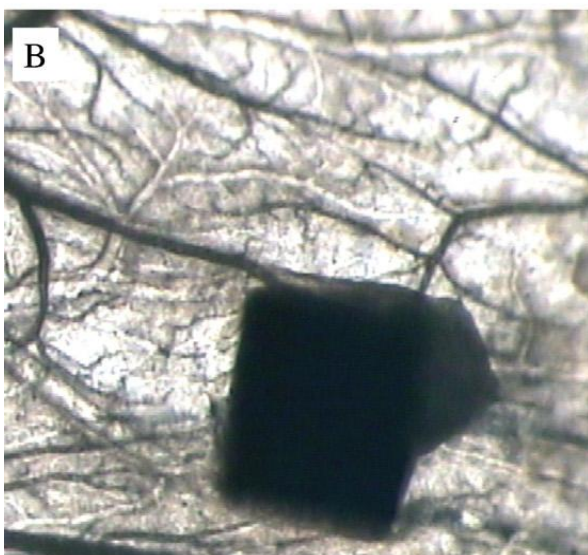
Οι Dolle και συνεργάτες [84] συνέκριναν την επίδραση διαφόρων αγωνιστών του NGF στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο ανασυνδυασμένος NGF από ποντίκια και ανθρώπους προκάλεσε ένα ασθενές, παρόλα αυτά στατιστικά σημαντικό ερεθιστικό σήμα. Αντίθετα, ο NGF από έχιδνα ενεργοποίησε τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτελεσματικότητα παρόμοια με αυτή του VEGF. Η μεγαλύτερη ισχύς του NGF από έχιδνα πιθανώς αποδίδεται στη γλυκοζυλίωση του ASN-21, η οποία απαντάται μόνο στον NGF από

έχιδνα [85] αλλά όχι στον ανασυνδυασμένο NGF από ποντίκια και ανθρώπους [86]. Η γλυκοζυλίωση του NGF έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη σταθερότητα, κάτι το οποίο πιθανώς οδηγεί στην πιο παρατεταμένη και άρα επαρκή ενεργοποίηση του υποδοχέα [86]. Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από τον NGF ανεστάλη πλήρως από τον ανταγωνιστή του TrkA υποδοχέα, k252a, αλλά όχι από τον SU-5416, έναν ειδικό αναστολέα για τον υποδοχέα 2 του VEGF (VEGFR-2), δείχνοντας μία άμεση δράση του NGF μέσω του υποδοχέα Trk στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [84].

vi. Αγγειογενετική δράση του NGF in vivo

Οι κλασσικές πειραματικές δοκιμές για τη μελέτη της αγγειογένεσης in vivo περιλαμβάνουν την χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου κοτόπουλου (CAM) και την ίριδα ή τον ανάγγειο αμφιβληστροειδή ποντικών [87, 88]. Ο NGF προκαλεί δόσοεξαρτώμενη αγγειογενετική απάντηση σε αμφιβληστροειδή ποντικών [89], καθώς και σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου κοτόπουλου και ορτυκιού [78, 90, 91]. Σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη στην οποία χορηγήθηκε NGF δημιουργήθηκαν αγγεία, τα οποία επεκτείνονταν ακτινωτά προς ένα σπόγγο ζελατίνης, ο οποίος είχε εμποτιστεί με NGF [78]. Η NGF επαγόμενη νεοαγγείωση σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου κοτόπουλου (εικόνα 13), ανεστάλη σημαντικά με τη χορήγηση από αντι-NGF αντισώματων και μερικώς από τη χορήγηση αντι-VEGF αντισώματων [78, 90, 91]. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν τη θεωρία της άμεσης αγγειογενετικής δράσης του εξωγενούς NGF και δεν αποκλείουν την πιθανότητα η προαγγειογενετική δράση του NGF να γίνεται έμμεσα, επηρεάζοντας την ισορροπία ανάμεσα σε άλλους

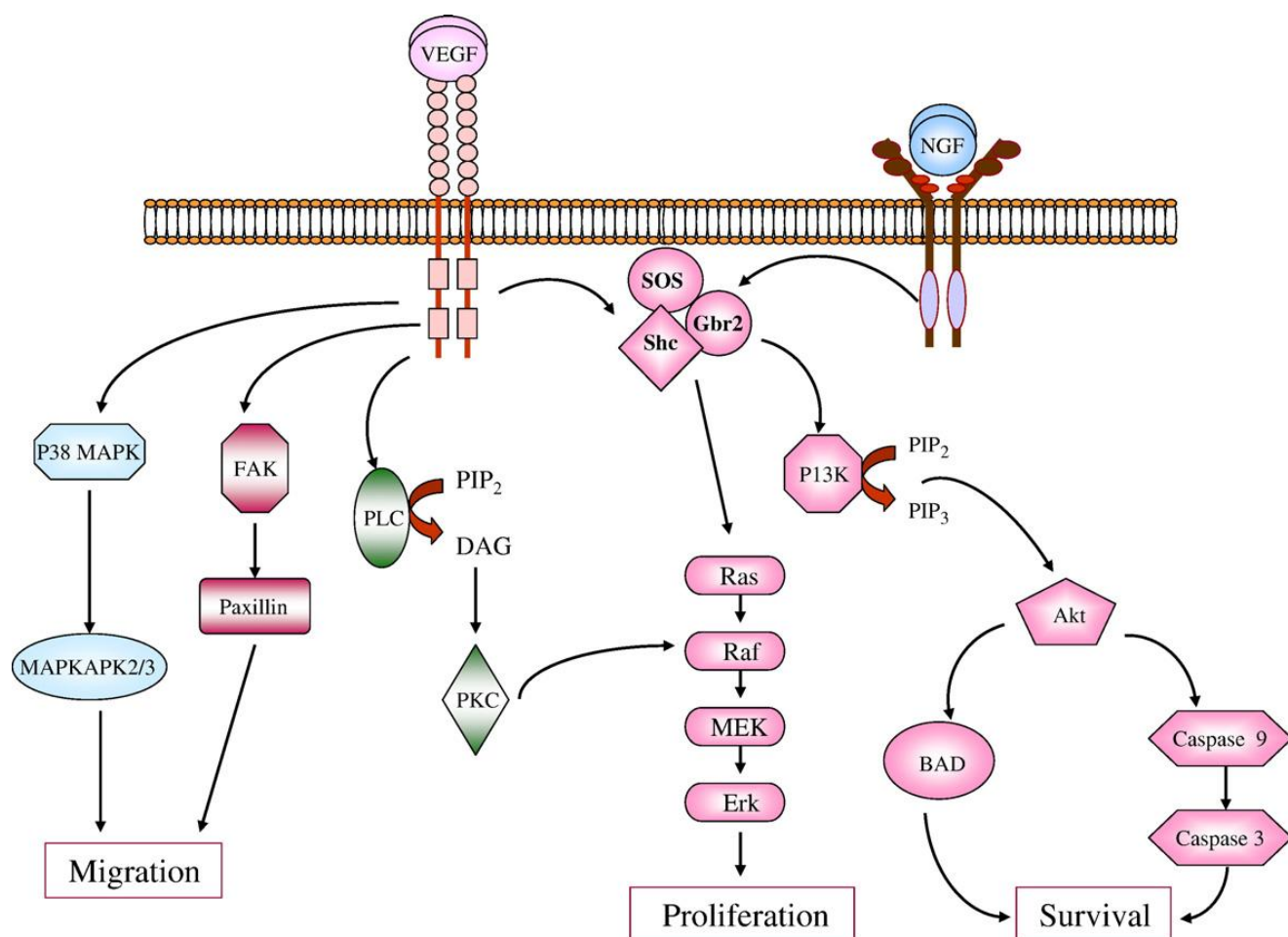
ενδογενείς προ- και αντι- αγγειογενετικούς παράγοντες στην αγγείωση της χοριοαλαντοειδικής μεμβράνης.



Εικόνα 13: Επίδραση του NGF στη νεοαγγείωση σε εμβρυική χοριοαλαντοειδική μεμβράνη νεοσσού[92]. Στην εικόνα A, ένας σπόγγος ζελατίνης εμποτισμένος με NGF περιβάλλεται από πολυάριθμα αλαντοειδικά αιμοφόρα αγγεία, που αναπτύσσονται ακτινωτά προς το εμφύτευμα. Στην εικόνα B σημειώνεται η απουσία αγγειακής αντίδρασης γύρω από έναν σπόγγο ζελατίνης ο οποίος είναι εμποτισμένος μόνο με το διαλύτη του NGF. Στην εικόνα C παρατηρείται σημαντικό βαθμού μείωση της αγγειογενετικής απάντησης όταν ο NGF χορηγήθηκε σε συνδυασμό με ειδικά αντι- NGF αντισώματα. Η μεγέθυνση στις ανωτέρω εικόνες είναι $\times 50$.

vii. **Αλληλεπίδραση ανάμεσα στον NGF και τον VEGF**

Η διέγερση από τον NGF και τον VEGF ενεργοποιεί δύο κοινούς ενδοκυτταρικούς σηματοδοτικούς καταρράκτες στα ενδοθηλιακά κύτταρα: τις οδούς Ras/ERK και P13K/Akt, οι οποίες αμφότερες εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Αυτό υποδηλώνει ότι ο NGF δρώντας σε συνέργεια με τον VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αγγειογενετικών διαδικασιών (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Κοινές οδοί μετάδοσης σημάτων ανάμεσα στον NGF και στον VEGF

Παλαιότερες μελέτες [93] έδειξαν ότι η χορήγηση NGF αποτρέπει την εκφύλιση των νευρικών κυττάρων που επάγεται από την 6-υδροξυτοπαμίνη (6-OHDA). Η 6-υδροξυτοπαμίνη είναι ένας

νευροτοξικός παράγοντας, ο οποίος προκαλεί εκλεκτική αλλά αναστρέψιμη καταστροφή των συμπαθητικών νευρικών άκρων σε ενήλικα ζώα και εκτεταμένες βλάβες σε σωματικά κύτταρα και θάνατο των νευρικών κυττάρων σε νεογέννητα ζώα [94].

Οι Calza και συνεργάτες [95], έδειξαν ότι η χορήγηση NGF και 6-υδροξυτοπαμίνης προκαλεί αύξηση του μεγέθους των αυχενικών συμπαθητικών γαγγλίων και υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη μορφή της τριχοειδικής ανάπτυξης σε νεογέννητους αρουραίους, δράση η οποία σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση του VEGF και της συνθετάσης του νευρωνικού νιτρικού οξέος στους νευρώνες. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο NGF πιθανώς εμπλέκεται στην επαγωγή της αύξησης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ανάπτυξη των τριχοειδών επάγεται από τον NGF μέσω της απελευθέρωσης του VEGF. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, η αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας και η λειτουργική ωρίμανση των νεοσχηματιζόμενων αγγείων μπορεί να ενεργοποιηθεί από την εξωγενή χορήγηση του NGF. Η τοπική χορήγηση NGF μέσω εμφυτευμάτων τα οποία απελευθερώνουν αργά τον NGF, προκάλεσε το σχηματισμό τριχοειδών σε νευρώνες που είχαν υποστεί μηχανική βλάβη [96].

Οι Hansen- Algenstaedt και συνεργάτες [97], έδειξαν ότι η υπερέκφραση του NGF σε φαιό λιπώδη ιστό ποντικών προκαλεί αύξηση τόσο του m-RNA όσο και των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGF και του VEGFR. Το ενεργοποιημένο VEGF σύστημα διεγείρει την αγγειογένεση και αυτή η δράση αναστέλλεται από αντισώματα που εξουδετερώνουν τον NGF.

Οι Julio- Pieper και συνεργάτες [98], διερεύνησαν το ρόλο του NGF στη ρύθμιση της έκφρασης των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF και TGF- β 1 στην περιοχή των αιμοφόρων αγγείων σε ωοθήκες ποντικών. Έδειξαν ότι ο NGF προκάλεσε αύξηση του m-RNA του VEGF και των πρωτεϊνικών επιπέδων σε καλλιέργειες νεογνικών ωοθηκών ποντικών. Επιπλέον, η κατάτμηση του άνω ωοθηκικού νεύρου, το οποίο αυξάνει το περιεχόμενο της ωοθήκης σε NGF, προκάλεσε αύξηση της ανοσοαντιδραστικότητας του VEGF και της περιοχής των τριχοειδικών αγγείων στις ωοθήκες προεφηβικών ποντικών συγκριτικά με ωοθήκες μάρτυρες.

viii. Ο ρόλος του NGF στην αγγειογένεση κατά την επούλωση πληγών

Η επούλωση πληγών χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό κοκκιωματώδους ιστού, ο οποίος αποτελείται από φλεγμονώδη κύτταρα, νεοσχηματισμένα αιμοφόρα αγγεία και ινοβλάστες, εμφυτευμένα σε ένα χαλαρό εξωκυττάριο στρώμα κολλαγόνου. Η αγγειογένεση περιορίζεται στην περιοχή της πληγής και έχει πρωτεύοντα ρόλο στην επιτυχή επούλωση. Ο FGF-2 και ο VEGF δρουν συνεργικά στην επούλωση χειρουργικών πληγών, όπου το αγγειογενετικό ερέθισμα που ξεκινάει από τον FGF-2 διατηρείται στη συνέχεια από τον VEGF [99].

Οι Graiani και συνεργάτες [100], έδειξαν ότι η τοπική χορήγηση NGF σε δερματικές πληγές διαβητικών ποντικών ενίσχυσε την επανορθωτική δημιουργία τριχοειδών και επιτάχυνε την επούλωση των πληγών. Αυτό συσχετίστηκε με τον τριπλασιασμό του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μείωση κατά 50% της απόπτωσης αυτών. Ποσοτική RT-PCR έδειξε αύξηση κατά 5,5

φορές της έκφρασης του VEGF μετά από την εξωγενή χορήγηση NGF σε διαβητικούς ιστούς [100]. Αυτή η μελέτη δείχνει την ύπαρξη νέων μηχανισμών που αφορούν την επουλωτική δράση του NGF και παρέχει νέους στόχους για τη θεραπεία των επιπλοκών του διαβήτη.

ix. Ο ρόλος του NGF στην αγγειογένεση κατά την ισχαιμία

Τα επίπεδα του m-RNA του NGF αυξήθηκαν κατά 2 έως 4 φορές μετά από μυοκαρδιακή ισχαιμία και επαναιμάτωση [101]. Οι Turrini και συνεργάτες [102], έδειξαν ότι η ισχαιμία οπίσθιων άκρων που προκλήθηκε από απόφραξη της μηριαίας αρτηρίας οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του ενδογενούς NGF στους προσαγωγούς και γαστροκνήμιους μύες. Επαναλαμβανόμενες υποδόριες εγχύσεις NGF σε ισχαιμικά οπίσθια άκρα επιτάχυναν τη διαδικασία επαναγγείωσης και προκάλεσαν αύξηση του αριθμού των αρτηριολίων. Αυτή η μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι ο NGF εκλεκτικά επάγει τον πολλαπλασιασμό των αρτηριολίων σε απάντηση σε ισχαιμία οπισθίων άκρων.

Οι Emanuelli και συνεργάτες [103], απέδειξαν ότι ο αυξημένος σε έκφραση NGF συμμετέχει στην επανορθωτική δημιουργία νέων τριχοειδών, η οποία ενεργοποιείται από την ισχαιμική βλάβη σε ποντίκια με αφαίρεση της μηριαίας αρτηρίας. Με μεθόδους ELISA και ανοσοϊστοχημείας, στη μελέτη αυτή τεκμηριώθηκε η αύξηση της έκφρασης του NGF και του υποδοχέα TrkA σε ισχαιμικούς μύες [103]. Επιπλέον, ο χρόνιος αποκλεισμός του NGF κατήργησε την αυτόματη δημιουργία νέων τριχοειδών σε απάντηση στην ισχαιμία και αύξησε την απόπτωση μυοκυττάρων. Τέλος, οι επαναλαμβανόμενες εγχύσεις NGF σε ισχαιμικούς μύες προκάλεσε αύξηση της πυκνότητας των τριχοειδών και των αρτηριολίων, μείωσε την απόπτωση ενδοθηλιακών και

μυοϊνωτικών κυττάρων και επιτάχυνε την επαναφορά της φυσιολογικής αιμάτωσης χωρίς να επηρεάσει τις συστηματικές αιμοδυναμικές παραμέτρους [103]. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι σε καταστάσεις ισχαιμίας η ενεργοποίηση της οδού του NGF προκαλεί εκκίνηση της αγγειογένεσης και ότι ο NGF θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία ισχαιμικής αγγειακής νόσου.

κ. Ο ρόλος του NGF στην αγγειογένεση σε όγκους

Η εξάρτηση της αύξησης των κακοήθων όγκων από την αγγειογένεση είναι μία καλά τεκμηριωμένη θεωρία στην βιολογία του καρκίνου [87]. Η αγγειογένεση είναι σημαντική στο να αυξάνει τη χορήγηση οξυγόνου, θρεπτικών συστατικών, αυξητικών παραγόντων, ορμονών και πρωτεολυτικών ενζύμων τα οποία ελέγχουν τα συστήματα πήξης και ινωδόλυσης, καθώς και τη διασπορά των καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένα σημεία [104].

Σε ορισμένα νεοπλάσματα τόσο νευρικής όσο και μη νευρικής προέλευσης, ο NGF μπορεί να ενεργοποιήσει ταυτόχρονα τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και των στρωματικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών.

Στο νευροβλάστωμα, ο TrkA ενεργοποιεί προαποπτωτικές σηματοδοτικές οδούς [105], ενώ σε άλλες μελέτες έχει βρεθεί ότι ο TrkA ενεργοποιεί τη διαφοροποίηση των νευρώνων [106-108]. Οι κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος δείχνουν γενικά μη ανταπόκριση στον NGF [109] και η έκφραση του TrkA εμφανίζει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την επιθετικότητα του νευροβλαστώματος, αποτελώντας έτσι έναν πιθανό δείκτη καλής πρόγνωσης [110, 111]. Οι Tacconelli και συνεργάτες [112], αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός μηχανισμού ρυθμιζόμενου από την υποξία για τον καθορισμό της επιθετικότητας

του νευροβλαστώματος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός διαφορετικού τρόπου κατάτμησης του TrkA με αποτέλεσμα την έκφραση ενός νέου συνεχώς ενεργού τύπου TrkAIII, που επάγει την καρκινογένεση. Πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ο TrkAIII επάγει την καρκινογενετική συμπεριφορά των κυττάρων του νευροβλαστώματος, μπορεί να περιλαμβάνουν τη δημιουργία ενός φαινοτύπου πιο ανθεκτικού στο stress και την αγγειογένεση, κάτι που υποδηλώνεται από τη σημαντική αύξηση της αγγειοβρίθειας που εμφανίζεται στους όγκους με το μεταλλαγμένο TrkA. Η υποξία βρέθηκε ότι αποτελεί ερέθισμα σε μία ποικιλία άλλων κυτταρικών τύπων καρκίνου, όπως ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς και το φαιοχρωμοκύττωμα ή άλλες κυτταρικές σειρές όπως το PC-3 του προστάτη, το A-549 του πνεύμονα και το MDA-MB-231 του μαστού [112].

Ορισμένες κυτταρικές σειρές ανθρώπινου γλοιοβλαστώματος είναι ευαίσθητες στον NGF, ο οποίος αυξάνει τις μιτώσεις μέσω του υποδοχέα TrkA. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός που προκλήθηκε από τον NGF είναι δυνατόν να ανασταλεί με δόσοεξαρτώμενο τρόπο από τον k252a [113]. Ο NGF μετρήθηκε με ELISA και ήταν ανιχνεύσιμος εντός όλων των κυτταρικών σειρών, κάτι το οποίο δείχνει ότι η κυτταρική αύξηση του γλοιοβλαστώματος είναι δυνατόν να αυξηθεί από τον NGF [113].

Ο NGF ενεργοποίησε την έκφραση του MMP-2 και προκάλεσε αύξηση της διείσδυσης από ανθρώπινα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα [114]. Η δράση αυτή προκαλείται από την ειδική πρόσδεση του NGF στον υποδοχέα του TrkA, η οποία παρατηρήθηκε σε όλα τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την

υπόθεση ότι ο NGF εμπλέκεται στην περινευρική διείσδυση των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων, ενισχύοντας τις διηθητικές ιδιότητές τους.

Υψηλή έκφραση του NGF ανιχνεύτηκε σε σειρές καρκινικών κυττάρων μαστού *in vitro*, καθώς και σε βιοψίες όγκων [115]. Αντίθετα, η παραγωγή NGF δεν ήταν ανιχνεύσιμη σε επιθηλιακά κύτταρα από φυσιολογικούς μαζικούς αδένες. Η έκφραση του TrkA είναι ανάλογη με τον ιστολογικό τύπο του όγκου. Η επιβίωση και η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού *in vitro* αναστέλλονται ισχυρά είτε με την εξουδετέρωση της δράσης του από αντισώματα εναντίον του NGF είτε από φαρμακολογικούς αναστολείς του υποδοχέα TrkA, κάτι που είναι υπέρ της αυτοκρινούς δράσης του NGF στα καρκινικά κύτταρα του μαστού [84].

Ο NGF, ο οποίος παράγεται από καρκινικά κύτταρα μπορεί, επίσης, να έχει έμμεσες επιδράσεις, όπως είναι η απελευθέρωση επιπρόσθετων αυξητικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Έτσι, η κατάργηση του σήματος του NGF μπορεί να αποτελεί χρήσιμη θεραπεία για κακοήθεις όγκους οι οποίοι παράγουν NGF.

Όσον αφορά τον πιθανό ρόλο του NGF στην καρκινική αγγειογένεση και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον NGF και τον VEGF, ο οποίος παράγεται από καρκινικά κύτταρα, υπάρχουν λίγα δεδομένα από τη βιβλιογραφία σε αυτό το θέμα. Οι Davidson και συνεργάτες [116], μελέτησαν την πιθανή σχέση ανάμεσα στην έκφραση του NGF, του TrkA και του φωσφο-TrkA (p-TrkA) σε ωοθηκικό καρκίνωμα και έδειξαν ότι ο p-TrkA εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ότι ο NGF συνυπήρχε με τον VEGF, κάτι που δείχνει ότι ο πιθανός προαγγειογενετικός ρόλος που έχει αποδοθεί στον NGF *in vitro*

και in vivo μπορεί να έχει σημασία και στην καρκινογένεση. Οι Middeke και συνεργάτες [117], έδειξαν ότι ο NGF προκάλεσε αύξηση του m-RNA του VEGF και συσσώρευση πρωτεΐνης VEGF σε κύτταρα PC12 από φαιοχρωμοκύττωμα τα οποία είχαν επιβεβαιωμένη μεταστατική ενεργότητα in vivo, κάτι που δείχνει ότι ο NGF μπορεί να επηρεάζει την έκφραση του VEGF και μπορεί να συνεισφέρει στην αγγειογένεση στο φαιοχρωμοκύττωμα.

2. Θρομβίνη

i. Φυσιολογία της θρομβίνης

Η θρομβίνη είναι μία πρωτεάση σερίνης που παράγεται στο αίμα από την ανενεργό πρόδρομη μορφή της, την προθρομβίνη. Η θρομβίνη έχει δύο σημαντικές αντικρουόμενες λειτουργίες [118]. Λειτουργεί ως προθρομβωτικός παράγοντας μετατρέποντας το ινωδογόνο σε έναν αδιάλυτο θρόμβο ινικής, ο οποίος συγκρατεί τα αιμοπετάλια στην περιοχή της βλάβης και εκκινά τις διαδικασίες που αφορούν την επούλωση των πληγών. Αυτή η ενέργεια ενισχύεται από:

- την ενεργοποίηση του παράγοντα XIII, ο οποίος σταθεροποιεί το θρόμβο ινικής,
- την αναστολή της ινωδόλυσης μέσω της ενεργοποίησης της οδού του αναστολέα ιστικού παράγοντα (TAFI)
- την πρωτεολυτική ενεργοποίηση των παραγόντων V, VIII και XI.

Η θρομβίνη δρα επίσης ως αντιπηκτικό μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C. Αυτή η λειτουργία λαμβάνει χώρα in vivo μέσω της πρόσδεσης της θρομβίνης στη θρομβομοντουλίνη, έναν ενδοθηλιακό μεμβρανικό υποδοχέα. Όταν συνδεθεί σε αυτόν τον υποδοχέα, η

δυνατότητα της θρομβίνης να μετατρέπει το ινωδογόνο καταστέλλεται, αλλά και η ειδικότητα του ενζύμου ως προς τη ζυμογόνο πρωτεΐνη C αυξάνεται σημαντικά. Αυτή η αντίδραση επιταχύνεται περαιτέρω από την παρουσία ενός ενδοθηλιακού κυτταρικού υποδοχέα της πρωτεΐνης C. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) καταστέλλει και απενεργοποιεί τους παράγοντες Va και VIIIa, δύο απαραίτητους συμπαράγοντες της πήξης, καθώς και τους παράγοντες Xa και IXa που απαιτούνται για την παραγωγή θρομβίνης. Με αυτόν τον μηχανισμό ο APC μειώνει την πρόοδο του καταρράκτη της πήξης [119]. Επιπλέον, η θρομβίνη αναστέλλεται μη αναστρέψιμα στην περιοχή της βλάβης από την αντιθρομβίνη, με τη βοήθεια της ηπαρίνης και με τον ειδικό για τη θρομβίνη συμπαράγοντα 2 της ηπαρίνης [120, 121].

Επιπρόσθετα στον κεντρικό της ρόλο στον καταρράκτη της πήξης, η θρομβίνη είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί σημαντικές κυτταρικές δράσεις. Ο βασικός μηχανισμός, ο οποίος είναι υπεύθυνος για αυτές τις κυτταρικές δράσεις της θρομβίνης μεσολαβείται από τους υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες (PARs), μία νέα οικογένεια G-υποδοχέων πρωτεΐνης [122]. Οι PARs χρησιμοποιούν ένα μηχανισμό με τον οποίο μετατρέπουν τις εξωκυττάρια πρωτεολυτικές δράσεις σε διαμεμβρανικά σήματα. Αυτοί οι υποδοχείς φέρουν τους δικούς τους συνδέτες, οι οποίοι παραμένουν σιωπηλοί μέχρι η θρομβίνη και άλλες πρωτεάσες να συνδεθούν σε ένα συγκεκριμένο σημείο στο εξωκυττάριο N άκρο, προκαλώντας διαμόρφωση ενός νέου N άκρου συνδέτη, το οποίο συνδέεται και ενεργοποιεί τον υποδοχέα. Ο PAR1 είναι το πρώτο μέλος αυτής της οικογένειας που τυποποιήθηκε. Πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχουν ενδείξεις ότι εκτός από τη θρομβίνη άλλες πρωτεάσες όπως η πλασμίνη, ο παράγοντας Xa, τα APCs, καθώς και η μεταλλοπρωτεάση

του στρώματος 1 (MMP-1), μπορούν να ενεργοποιήσουν αυτόν τον υποδοχέα κάτω από ορισμένες συνθήκες και να επάγουν σήματα. Εκτός από τον PAR1, ο PAR4 επίσης έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται ειδικά από τη θρομβίνη.

ii. **Αλληλεπίδραση ανάμεσα στο σύστημα πήξης και τις διαδικασίες αγγειογένεσης**

Η ενεργοποίηση του συστήματος πήξης, η θρόμβωση των αγγείων και η εναπόθεση εξωκυττάριας ινικής είναι κοινά πρώιμα βήματα σε πολλές παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Η πήξη και το αιμοστατικό βύσμα παρέχουν το βασικό ερέθισμα για την έναρξη της αγγειογενετικής απάντησης, η οποία κινητοποιείται από τη φλεγμονή, την καταστροφή ιστών και την επούλωση πληγών [123-125]. Παρομοίως, παράγοντες του συστήματος πήξης επιδρούν στη βιολογία του καρκίνου [126].

Ο ιστικός παράγοντας (TF) έχει αναγνωριστεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της αγγειογένεσης [127]. Ο TF εκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων και η αυξημένη έκφραση του TF σε όγκους σχετίζεται με αυξημένη αγγειογένεση και υψηλότερο grade του όγκου [128-131]. Η αγγειογένεση που προκαλείται από τον TF φαίνεται να οφείλεται στην αύξηση της παραγωγής VEGF και στη μείωση της θρομβοσπονδίνης [132, 133]. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο TF επάγει την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης του κυτταροπλασματικού του τμήματος. Η φωσφορυλίωση αυτού του τμήματος έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική μετανάστευση και την ενεργοποίηση των σημάτων PAR [134](31). Η ενεργοποίηση του PAR1 και του PAR2 οδηγεί στην επιτάχυνση της αγγειογένεσης [135].

Επιπρόσθετα, ο APC και ο αναστολέας της πρωτεΐνης C (PCI) έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρουν όχι μόνο στη ρύθμιση της αιμόστασης αλλά και στην κυτταρική φλεγμονή, πολλαπλασιασμό, απόπτωση και στην αγγειογένεση [136]. Όσον αφορά την αγγειογένεση έχει δημοσιευτεί έρευνα στην οποία φαίνεται ότι ο APC αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων και την αγγειογένεση, μέσω ενεργοποίησης πολλαπλών οδών από τους υποδοχείς APC [137]. Επίσης, τα PCI φάνηκε ότι αναστέλλουν την αύξηση και τη μεταστατική ικανότητα καρκινικών κυττάρων από καρκίνο του μαστού και την αγγειογένεση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από την ανασταλτική πρωτεολυτική δράση [138].

Είναι ενδιαφέρον ότι η θρομβίνη, η οποία αποτελεί την τελική κοινή ουσία στον καταρράκτη της πήξης έχει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση [139]. Το αγγειογενετικό αποτέλεσμα της θρομβίνης παρουσιάστηκε πρώτα σε μελέτη σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου κοτόπουλου [140]. Η θρομβίνη προκάλεσε επαγωγή του σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων χορηγούμενη σε πήγμα matrigel, το οποίο είχε εγχυθεί υποδορίως σε ποντίκια [141]. Σε αυτά τα δύο *in vivo* συστήματα φάνηκε ότι η αγγειογενετική δράση της θρομβίνης είναι δόσοεξαρτώμενη και απαιτεί το καταλυτικό σημείο της θρομβίνης να είναι ενεργό. Η αγγειογενετική δράση της θρομβίνης μεσολαβείται από υποδοχέα και είναι ανεξάρτητη από το σχηματισμό ινικής, άρα μπορεί να τροποποιηθεί χωρίς να υπάρξει παρεμβολή στην πήξη του αίματος.

iii. Ρόλος της θρομβίνης στην αγγειογένεση

Η θρομβίνη έχει αποδειχθεί ότι έχει βασικό ρόλο τόσο στην παθολογική όσο και στη φυσιολογική αγγειογένεση [142]. Οι

αγγειογενετικές της δράσεις διαχωρίζονται σε αυτές που μεσολαβούνται από τους υποδοχείς PAR και σε αυτές που είναι ανεξάρτητες από αυτούς.

Η θρομβίνη μέσω της σηματοδότησης PAR1, ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ρυθμίζει την απελευθέρωση, έκφραση και ενεργοποίηση της πλειοψηφίας των αγγειογενετικών μεσολαβητών. Η αγγειογένεση που επάγεται από τη θρομβίνη σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου κοτόπουλου σχετίζεται με την αύξηση της παραγωγής του VEGF καθώς και της αγγειοποιητίνης-2 (Ang-2)[143]. Σε συμφωνία με αυτό, η θρομβίνη αυξάνει την παραγωγή VEGF [144] και Ang-2[145] σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Μία άλλη σημαντική επίδραση την θρομβίνης είναι η αύξηση της μιτογόνου δράσης του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα [146]. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η θρομβίνη αυξάνει την παραγωγή του HIF-1α κάτω από μη υποξικές συνθήκες μέσω ROS εξαρτώμενων μηχανισμών τόσο στα ενδοθηλιακά κύτταρα [147] όσο και στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων [148]. Η θρομβίνη ενεργοποιεί επίσης τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων δρώντας απευθείας ως μιτογόνος παράγοντας [149]. Επιπλέον, ο neuron-derived-orphan υποδοχέας 1, ένας πυρηνικός υποδοχέας, έχειδειχθεί ότι μεσολαβεί στη μιτογόνο και μεταναστευτική επίδραση της θρομβίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα [150]. Η θρομβίνη επιπλέον επηρεάζει τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω σημάτων του PAR1, ο οποίος μειώνει τη δυνατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων να προσκολλώνται στις εξωκυττάριες πρωτεΐνες του στρώματος [151]. Αυτή η δράση της θρομβίνης, μαζί με την ικανότητά της να ενεργοποιεί τον MMP-2 ανεξαρτήτως του PAR1 [152], είναι μεγάλης σημασίας κατά τα αρχικά στάδια της

αγγειογένεσης, όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα πρέπει να αποκολληθούν από τα σημεία που βρίσκονται στην αρχή εντός του τοιχώματος των αγγείων, να αποδομήσουν την περιβάλλουσα βασική μεμβράνη και να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένα σημεία, να πολλαπλασιαστούν και να σχηματίσουν τον αυλό των νέων αγγείων.

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι εκτός από την ενεργοποίηση του PAR1, ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 41 αμινοξέα και το οποίο παράγεται από τη θρομβίνη, έχει αποδειχθεί ότι έχει βιολογικές δράσεις [153]. Το πεπτίδιο αυτό ονομάστηκε παρστατίνη. Η παρστατίνη δρα με διάφορους μηχανισμούς και έχει αποδειχθεί ότι ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση κατά τη διάρκεια ισχαιμίας και επαναιμάτωσης στο μυοκάρδιο ποντικών [154]. Επίσης, η παρστατίνη προκαλεί αγγειοδιαστολή σε στεφανιαία αγγεία ποντικών. Αμφότερες αυτές οι δράσεις εξαρτώνται από οδούς NO συνθάσης και K_{ATP} .

Κατά τη διάρκεια της επούλωσης των πληγών, της φλεγμονής ή κατά την ανάπτυξη κακοήθων όγκων, το ινωδογόνο του πλάσματος εξαγγειώνεται, συνδέεται σε ειδικούς υποδοχείς σε φλεγμονώδη και καρκινικά κύτταρα και αποδομείται από τη θρομβίνη, που παράγεται στο τοπικό μικροπεριβάλλον [124, 155]. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι αυτό το δίκτυο ινικής έχει υποστηρικτικό ρόλο για την προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων [156-158]. Το δίκτυο ινικής παρέχει επίσης αποθηκευτικό χώρο για τους προαγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες όπως ο b-FGF, ο VEGF και ο αυξητικός παράγοντας που προσομοιάζει την ινσουλίνη-1 (Insulin-like Growth Factor-Ilgf-1). Εντός την ινικής, οι αυξητικοί παράγοντες προστατεύονται από την πρωτεολυτική αποδόμηση [159]. Με παρόμοιο τρόπο είναι γνωστό ότι η θρομβίνη παγιδεύεται μέσα στο δίκτυο ινικής και

προστατεύεται από την απενεργοποίηση από τους κυκλοφορούντες αναστολείς. Η πρόσδεση της θρομβίνης στην ινική ή στην υποενδοθηλιακή εξωκυττάρια ουσία επιτρέπει στην πλειοψηφία των μορίων να είναι λειτουργικά και διαθέσιμα για αλληλεπίδραση με κύτταρα [160]. Επίσης, η θρομβίνη έχει προταθεί ως νέος συνδέτης για τις ιντεγκρίνες ανβ3 και α5β1 [161]. Οι ανωτέρω δράσεις της θρομβίνης συνεισφέρουν στην έναρξη της αγγειογένεσης παρέχοντας μία πιθανή εξήγηση για την αγγειογένεση μέσα σε θρόμβους σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, μία πολύ κοινή κλινική παρατήρηση είναι ότι μετά τη θρόμβωση σε μεγάλες φλέβες ο θρόμβος επανασηραγγοποιείται με νέα αγγεία τα οποία είναι ορατά αγγειογραφικά. Είναι ενδιαφέρον ότι πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η θρομβίνη συνδέεται στο θρόμβο ινικής και δίνει αγγειογενετικές και αιμοστατικές ιδιότητες στα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία φαίνεται ότι εμπλέκονται στην επανασηραγγοποίηση του φλεβικού θρόμβου [162].

Έχουν συσσωρευτεί αρκετά στοιχεία τα οποία δείχνουν ότι η θρομβίνη έχει αντιαποπτωτική δράση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών, των νευρωνικών κυττάρων, των ινοβλαστών και των καρκινικών κυττάρων [163]. Σε αυτά τα κύτταρα η ενεργοποίηση του PAR1 έχει αποδειχθεί ότι είτε προάγει είτε αναστέλλει την απόπτωση ανάλογα με τη συγκέντρωση θρομβίνης. Αντίθετα προς αυτές τις παρατηρήσεις σε άλλους κυτταρικούς τύπους βρέθηκε πρόσφατα ότι η θρομβίνη προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την απόπτωση μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο ο PAR1 έχει περιορισμένη συνεισφορά [164]. Μία ποικιλία μηχανισμών έχουν προταθεί για αυτήν την προστατευτική δράση. Το συμπέρασμα,

ωστόσο, είναι ότι η δράση αυτή παρέχει ένα νέο πεδίο έρευνας για την πιθανή συνεισφορά της θρομβίνης στην αγγειογένεση. Μέσω των πολλαπλών επιδράσεων της η θρομβίνη φαίνεται ότι έχει έναν ξεχωριστό ρόλο στην ενορχήστρωση των απαιτήσεων για την ανάπτυξη ώριμων αγγείων. Ο βασικός στόχος της αγγειογενετικής θεραπείας είναι να αναπτυχθούν παράπλευρα αγγεία, τα οποία είναι σταθερά και μπορούν να παρέχουν αρκετή αιματική ροή στον ισχαιμικό ιστό [165]. Πράγματι, η θρομβίνη σε μοντέλο ισχαιμίας οπίσθιων άκρων κονίκλου έχει δείξει ότι με την ενδομυϊκή έγχυση στην περιοχή της ισχαιμίας αυξάνεται η αγγειογένεση και η δημιουργία μεγάλων παράπλευρων αγγείων [166]. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζονται περαιτέρω από άλλες αναφορές που έχουν δείξει ότι η θρομβίνη αυξάνει σημαντικά όχι μόνο τον αριθμό των αγγείων σε μοντέλο χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης εμβρύου κοτόπουλου αλλά και τη διάμετρο και το μήκος αυτών [167]. Επιπρόσθετα, η χρήση αντιθρομβωτικών φαρμάκων μετά από την πρόκληση ισχαιμίας ανέστειλε την αυτόματη αγγειογενετική απάντηση σε μοντέλο ισχαιμίας τρωκτικών [168]. Παρομοίως, η ενδομυϊκή έγχυση στοιχείων ινικής αύξησε την αγγειογένεση σε μοντέλο ισχαιμίας οπίσθιων άκρων κονίκλων [169].

3. Άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες

i. Γονίδια στόχοι από αυξητικούς παράγοντες

- **Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) και υποδοχείς του**

Η οικογένεια του VEGF είναι ο πιο ευρέως μελετημένος αυξητικός παράγοντας. Αποτελείται από επτά κύρια ισομερή: VEGF-A έως VEGF-E

και PLGF-1 και PLGF-2. Ο όρος VEGF συχνά χρησιμοποιείται αναφερόμενος στον VEGF-A, το ισομερές που έχει σημαντικό ρόλο στην μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις καλά μελετημένες μορφές του VEGF-A, οι οποίες είναι οι VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, και VEGF-206, με τον VEGF-165 να είναι ο πιο δραστικός βιολογικά [170]. Ο VEGF αλληλεπιδρά με αρκετούς επιφανειακούς υποδοχείς ενδοθηλιακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των VEGFR-1 (Flt-1) και VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Αν και ο ρόλος του VEGFR-1 δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός, ο VEGFR-2 είναι γνωστό ότι αντιδρά στον VEGF-A, καθώς και σε παραλλαγές των VEGF-C και VEGF-D, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αγγειογένεσης [170]. Ο τρίτος υποδοχέας VEGFR-3 (Flt-4) αντιδρά στον VEGF-C και VEGF-D και εμπλέκεται στη διαδικασία της λεμφαγγειογένεσης [170]. Αν και έχουν γίνει πολλές προκλινικές *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα με τις διάφορες μορφές του VEGF στο παρελθόν, οι κλινικές δοκιμές δεν έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα, με εξαίρεση τη μελέτη του Makinen και των συνεργατών του, η οποία έδειξε βελτίωση μόνο στον πρωτεύοντα στόχο [171].

- **Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (Fibroblast Growth Factor, FGF) και σχετιζόμενα γονίδια**

Η οικογένεια του FGF αποτελείται από τουλάχιστον 23 δομικά παρόμοιες πρωτεΐνες, εκ των οποίων ο FGF-1 (γνωστός και ως aFGF) και ο FGF-2 (γνωστός και ως bFGF) είναι οι πιο καλά μελετημένοι. Ο FGF είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης και ισχυρός μεσολαβητής της μετανάστευσης, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων [172]. Συνδέεται επίσης στους υποδοχείς της ηπαρίνης με υψηλή συνάφεια, μετατρέποντας τους σε

συνυποδοχείς σε μία από της τέσσερις γνωστές οικογένειες των υποδοχέων του FGF [173]. Σε πρώτες μελέτες σε πειραματόζωα ο FGF βελτίωσε την αιμάτωση σε μοντέλα ισχαιμίας των άκρων [174]. Έτσι διενεργήθηκαν αρκετές κλινικές δοκιμές φάσης I και II προκειμένου να εκτιμηθεί το όφελος του FGF στην περιφερική αρτηριοπάθεια. Σε μία από αυτές (μελέτη TALISMAN) μελετήθηκε η ασφάλεια της ενδομυϊκής χορήγησης ενός μη ιικού FGF πλασμιδίου DNA (NV1FGF) έναντι της χορήγησης placebo σε ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία [175]. Τυχαιοποιήθηκαν 125 ασθενείς, οι οποίοι έλαβαν πολλαπλές ενέσεις NV1FGF ή φυσιολογικού ορού. Στις 52 εβδομάδες δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο βαθμό επούλωσης των ελκών ανάμεσα στις δύο ομάδες. Ωστόσο φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό ακρωτηριασμού και στη συνολική επιβίωση. Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη φάσης III (TAMARIS) 525 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν και έλαβαν είτε NV1FGF ενδομυϊκά, είτε φυσιολογικό ορό. Σε αυτούς τους ασθενείς, οι οποίοι έπασχαν από κρίσιμη ισχαιμία μη ανταποκρινόμενη στη θεραπεία, ο NV1FGF δεν ήταν αποτελεσματικός στη μείωση του διαστήματος πριν από μείζονα ακρωτηριασμό ή θάνατο [176]. Εξάλλου η χορήγηση δεν μείωσε ούτε το σύνολο των ακρωτηριασμών και δεν βελτίωσε των πόνο ηρεμίας, την επούλωση των ελκών ή τη λειτουργικότητα των ασθενών, έχοντας έτσι συνολικά απογοητευτικά αποτελέσματα. Τα αίτια στις διαφορές των αποτελεσμάτων ανάμεσα σε αυτές τις δύο μελέτες είναι πολλαπλά. Ο μικρός αριθμός ασθενών της μελέτης TALISMAN μπορεί να οδήγησε σε ψευδή-τυχαία αποτελέσματα. Η ετερογένεια των ασθενών στη μελέτη TAMARIS πιθανώς συνετέλεσε στο αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ το υψηλό ποσοστό συνοδών νοσημάτων των ασθενών που μετείχαν σε αυτή όπως

διαβήτη και υπερλιπιδαιμία πιθανώς επηρέασε την απάντηση στη θεραπεία.

- **Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (Hepatocyte Growth Factor, HGF) και σχετιζόμενα γονίδια**

Ο HGF είναι μια κυτοκίνη, η οποία αρχικά ονομάστηκε παράγοντας που προέρχεται από το μεσέγγυμα. Είναι γνωστό ότι ο HGF ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τον κυτταρικό θάνατο και την αγγειογένεση μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα του, ο οποίος είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης που κωδικοποιείται από το πρωτοογκογονίδιο C - MET[177, 178]. Σε πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας οπισθίων άκρων ο HGF έδειξε να προάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση [179]. Αρκετές μελέτες έγιναν και σε ανθρώπους για τη θεραπεία της ισχαιμίας των άκρων με την χρήση ενός πλασμιδίου DNA το οποίο κωδικοποιεί τον HGF. Ο Pauel και οι συνεργάτες του έδειξαν σε μια μελέτη φάσης 2 (HGF –STAT τυχαιοποιημένη μελέτη), ότι οι ασθενείς με πόνο ηρεμίας και ισχαιμικά έλκη, οι οποίοι έλαβαν την μεγαλύτερη εκ των τριών αυξανόμενων ενδομυϊκών δόσεων του HGF πλασμιδίου DNA είχαν βελτίωση στην αιμάτωση των άκρων στους 6 μήνες συγκριτικά με αυτούς που έλαβαν τον μάρτυρα [180]. Ωστόσο, δε φάνηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά ακρωτηριασμών, στην επούλωση των ελκών, και στη βελτίωση του σφυροβραχιονίου δείκτη. Ο Morishita και οι συνεργάτες του έδειξαν σε μια μελέτη φάσης II ότι η ενδομυϊκή έγχυση του HGF πλασμιδίου DNA σε ασθενείς με ισχαιμία των κάτω άκρων, ήταν ασφαλής και βελτίωσε κλινικά στους ασθενείς [181, 182]. Σε μελέτη φάσης III ο Shigematsu και οι συνεργάτες του έδειξαν βελτίωση της επούλωσης των ελκών, χωρίς

ωστόσο βελτίωση του πόνου ηρεμίας και του σφυροβραχιονίου δείκτη μετά από 12 βδομάδες χορήγησης του HGF. Μετά από αυτές τις μελέτες, μία πολυκεντρική μελέτη φάσης III βρίσκεται σε εξέλιξη με σκοπό να συμπεριληφθούν πάνω από 500 ασθενείς με περιφερική αρτηριοπάθεια, οι οποίοι δεν έχουν άλλες θεραπευτικές επιλογές.

- **Αναπτυξιακός τοπικός ενδοθηλιακός- 1 (Developmental endothelial locus-1, Del-1)**

Ο Del-1 είναι μία εξωκυττάρια πρωτεΐνη στρώματος, η οποία εκφράζεται νωρίς κατά την ανάπτυξη και επηρεάζει την ενδοθηλιογένεση [183]. Ο Del-1 είναι γνωστό ότι αναστέλλει την προσέλκυση κυττάρων φλεγμονής και θα μπορούσε να αποτελέσει μια βάση για στόχευση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα λευκοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε αγγειακές ασθένειες. Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα συμπλέγματα των υποδοχέων ιντεγκρίνης $\alpha v\beta 3$ / $\alpha v\beta 5$ με τον Del-1 είναι κρίσιμη στην καρκινική αγγειογένεση [184]. Σε πειραματικά μοντέλα εξάλλου ο Del-1 φάνηκε να διεγείρει σημαντικά την αγγειογενετική απάντηση και να προάγει τη βελτίωση της λειτουργίας σε μοντέλα ισχαιμίας οπίσθιων άκρων. Ωστόσο, σε μοντέλα καρδιακής ισχαιμίας τα αποτελέσματα είναι διφορούμενα [185, 186]. Έχει πραγματοποιηθεί μελέτη φάσης II (DELTA-1) στην οποία τυχαιοποιήθηκαν 105 ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή αμφοτερόπλευρη περιφερική αρτηριοπάθεια. Οι ασθενείς έλαβαν είτε ενδομυϊκή ένεση του VLTS-589, ενός πλασμιδίου του DNA που κωδικοποιεί τον Del-1 αναμεμιγμένο με rolaxamer-188, είτε έλαβαν μόνο rolaxamer 188 ως μάρτυρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο Del-1 που εκφράστηκε από το πλασμίδιο DNA προκάλεσε σημαντική βελτίωση στη δυνατότητα άσκησης και στον σφυροβραχιόνιο δείκτη

συγκριτικά με το αρχικό επίπεδο στις 30, στις 90 και στις 180 μέρες. Εντούτοις, η ίδια βελτίωση προκλήθηκε και από τη χορήγηση μόνο του roloxamer 188 και η διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες δεν ήταν στατιστικά σημαντική[187]. Επακολούθησε δεύτερη μελέτη φάσης IIb με στόχο να διερευνηθεί πιθανότητα το roloxamer-118 να προκάλεσε αγγειογένεση και συγκρίθηκε αυτό με τη χορήγηση φυσιολογικού ορού. Ωστόσο, δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε ανάμεσα σε αυτές τις δύο ομάδες.

- **Παράγοντας που επάγεται από την υποξία 1 (Hypoxia Inducible Factor-1, HIF-1)**

Ο HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερικός μεταγραφικός παράγοντας που προκαλεί προσαρμοστικές απαντήσεις στην υποξία και την ισχαιμία στα ευκαριωτικά κύτταρα. Ο HIF-1 αποτελείται από τον HIF-1α, ο οποίος ρυθμίζεται από το οξυγόνο και από τον HIF-1β (ARNT), ο οποίος εκφράζεται συνεχώς ανεξαρτήτως της παρουσίας του οξυγόνου[188]. Όταν η πίεση του οξυγόνου είναι χαμηλή, ο HIF-1α μεταφέρεται στον πυρήνα, δημιουργεί ένα διμερές με τον HIF-1β, με αποτέλεσμα να μεταγράφονται γονίδια τα οποία κωδικοποιούν αγγειογενετικές κυτοκίνες, όπως είναι ο VEGF, ο PDGF, η αγγειοποιητίνη 2, ο παράγοντας 1 ο οποίος προέρχεται από στρωματικά κύτταρα (SDF -1), ο PLGF και ο SCF (stem cell factor). Όλοι οι ανωτέρω παράγοντες έχει αποδειχτεί ότι προάγουν την νεοαγγειογένεση σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων [189, 190]. Αυτοί οι προαγγειογενετικοί παράγοντες στη συνέχεια συνδέονται με υποδοχείς στην επιφάνεια των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και των αγγειακών περικυττάρων ή λείων μυϊκών κυττάρων και προάγουν την αγγειογένεση [188]. Ωστόσο, σε συνθήκες φυσιολογικής πίεσης

οξυγόνου, ο HIF-1α αποδομείται από την προλι-4 υδροξυλάση – 2, (PHT2), η οποία τροποποιεί τον HIF-1α με την προσθήκη υδροξυλικών ομάδων [191]. Μετά την προλι – υδροξυλίωση του HIF-1 η PVHL πρωτεΐνη, συνδέεται με τον HIF-1 πυροδοτώντας την προσέκλυση της E3 ubiquitin πρωτεϊνικής λιγάσης, προκαλώντας τελικά την αποδόμηση του HIF-1α. Στοιχεία από μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA και των πρωτεϊνών του HIF-1α αυξάνονται στα ισχαιμικά άκρα την τρίτη μέρα μετά την απολίνωση της μηριαίας αρτηρίας, την ίδια μέρα δηλαδή που αυξάνεται και η έκφραση του mRNA των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων που αναφέρθηκαν [192]. Εξάλλου, σε μοντέλο ισχαιμίας οπίσθιων άκρων κονίκλου, φάνηκε ότι η ενδομυϊκή συνεχής έγχυση ενεργού HIF-1α, προάγει την αρτηριογένεση και την αγγειογένεση [193].

Σε συνέχεια των δύο ανωτέρω πειραματικών μελετών, πραγματοποιήθηκαν δύο κλινικές μελέτες σε ανθρώπους . Σε μια πρόσφατη μελέτη φάσης I, στην οποία χρησιμοποιήθηκε αδενοϊός ώστε να χορηγηθεί ενεργός HIF-1 α σε ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία, η χορήγηση βρέθηκε ότι ήταν ασφαλής και καλά ανεκτή [194].

Πρόσφατα δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα μιας παρόμοιας φάσης II τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης ονομαζόμενης WALK [195]. Σε αυτή τη μελέτη χορηγήθηκαν ενδομυϊκά ιικά τεμάχια, τα οποία περιελάμβαναν HIF-α , τυχαιοποιημένα σε 289 ασθενείς με σοβαρή αμφοτερόπλευρη διαλείπουσα χωλότητα. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές αντοχής με κυλιόμενο διάδρομο κατά την αρχή της θεραπείας, καθώς και τον 3ο τον 6ο και τον 12ο μήνα μετά τη θεραπεία. Ο πρωταρχικός στόχος ήταν η αλλαγή του μέγιστου χρόνου βάδισης από την αρχή της θεραπείας έως τους 6 μήνες. Ο δευτερεύων στόχος ήταν η αλλαγή του

χρόνου έναρξης της διαλείπουσας χωλότητας, ενώ τριτεύοντες στόχοι ήταν οι αλλαγές του σφυροβραχιονίου δείκτη και της απόστασης βάρδισης. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν διαφορές σε κανέναν από τους στόχους, συγκριτικά με τους μάρτυρες, και το συμπέρασμα ήταν ότι αυτός ο τρόπος χορήγησης του HIF-1 δεν είναι αποτελεσματικός για τη θεραπεία της σοβαρής διαλείπουσας χωλότητας. Υπάρχουν πολλαπλοί λόγοι εξαιτίας των οποίων μπορεί η συγκεκριμένη μελέτη να απέτυχε:

1. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν η συνεχής έκφραση του HIF-1α έχει κάποια κλινική σημασία σε συνθήκες φυσιολογικής πίεσης οξυγόνου, όπως είναι οι ασθενείς με διαλείπουσα χωλότητα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, σε αντίθεση με τους ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία. Σε πειραματόζωα οι μελέτες έχουν γίνει σε κρίσιμη ισχαιμία κάτω άκρων.

2. Ο τρόπος χορήγησης μέσω ενός ιικού φορέα μπορεί να είναι αναποτελεσματικός στους σκελετικούς μυς των ασθενών, και πιθανώς ο HIF-1α να αποδομήθηκε πριν φτάσει τους ιστούς στόχους.

3. Ο χρόνος που χρειάζεται για την επαρκή έκφραση των γονιδίων σε συνδυασμό με τα γενετικά χαρακτηριστικά των ατόμων που έλαβαν τη θεραπεία μπορεί να επηρεάζει τα κλινικά αποτελέσματα

4. Η χορηγηθείσα δόση ιικών τεμαχίων μπορεί να είναι ανεπαρκής για το κατάλληλο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες, ειδικά σε ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία και πιθανώς με χρήση και σύγκριση διαφορετικών τρόπων χορήγησης του παράγοντα, ώστε να απαντηθούν κάποια από τα παραπάνω ερωτήματα[54].

ii. Γονίδια στόχοι από μικρά μόρια

Υπάρχουν αρκετά πιθανά μη συμβατικά γονίδια στόχοι, καθώς και μικρομοριακές ουσίες, οι οποίες έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε πειραματικές μελέτες. Είναι ενδιαφέρον ότι πολλοί από αυτούς τους πιθανούς στόχους ρυθμίζονται από την τάση του οξυγόνου κι έτσι ενεργοποιούν την οδό του HIF-1α ώστε να επάγουν την αγγειογένεση.

• Αναστολείς της προλυλ-4-υδροξυλάσης

Οι προλυλ-4-υδροξυλάσες (PHD-1, PHD2 και PHD3) είναι μια οικογένεια ενζύμων που έχουν ως στόχο την αποδόμηση του HIF-1 και αποτελούν κλειδί για τη φυσιολογική ρύθμιση της κυτταρικής υποξίας. Σε συνθήκες φυσιολογικής πίεσης οξυγόνου, ο PHD2 προκαλεί την υδροξυλίωση της προλίνης στο σημείο 402 και/ ή 564 χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το οξυγόνο και την α-οξογλουταράτη. Τα ανωτέρω έχουν ως αποτέλεσμα την αποδόμηση του HIF-1 σε συνθήκες φυσιολογικής πίεσης οξυγόνου. Υπάρχει μια σειρά μικρών μορίων τα οποία αναστέλλουν τα PHD ένζυμα [196, 197]. Για παράδειγμα το PR39 είναι ένα πεπτίδιο πλούσιο σε προλίνη και αργινίνη που ενεργοποιεί την αγγειογένεση έμμεσα αναστέλλοντας τον PHD2 και άρα εμποδίζοντας την πρωτεολυτική αποδόμηση του HIF-1α. Αυτή η οδός επομένως παρέχει μια εναλλακτική λύση στην παράταση της βιοδιαθεσιμότητας του HIF-1α σε καταστάσεις ισχαιμίας. Η συγχορήγηση του HIF-1α μαζί με τον PR39 μέσω μικρού φορέα DNA, έχει δείξει κάποιου βαθμού καρδιοπροστασία σε πειραματικά μοντέλα καρδιακής νόσου [198, 199]. Μία άλλη εναλλακτική προσέγγιση στην αναστολή του PHD είναι η κατασκευή μικρών μορίων RNA, τα οποία επάγουν την έκφραση του PHD2 και άρα αυξάνουν τη σταθερότητα του

HIF-1α και την ενεργότητά του σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας [200]. Δεν υπάρχουν ακόμη σαφείς ενδείξεις για το αν η χορήγηση των αναστολέων του PHD μπορεί να είναι κλινικά χρήσιμη στη θεραπεία της περιφερικής αρτηριοπάθειας. Υπάρχουν επίσης ενδοιασμοί για το κατά πόσο θα μπορούσαν να προκαλέσουν αύξηση της πιθανότητας ανάπτυξης κακοηθών όγκων. Περαιτέρω αντίληψη του θέματος μπορεί να προκύψει από διάφορες κλινικές δοκιμές, οι οποίες είναι σε εξέλιξη, και που χρησιμοποιούν αυτούς τους αναστολείς για να θεραπεύσουν άλλα νοσήματα, όπως η αναιμία.

- **Το σύστημα της θιορεδοξίνης**

Το σύστημα της θιορεδοξίνης (Trx) αποτελείται από redox (αναγωγικές) πρωτεΐνες, η λειτουργία των οποίων είναι να μειώνουν τις οξειδωμένες κυστεΐνες στο ενδοθήλιο μέσω μιας αντίδρασης η οποία εξαρτάται από ένα νικοτιναμινο -αδενινο- φωσφοροδινουκλεοτίδιο (NADPH). Η κλασική αντίδραση του συστήματος της θιορεδοξίνης, η οποία προκαλεί μείωση της οξείδωσης, καταλύεται / περιλαμβάνει την ανακύκλωση των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων ανάμεσα στην Trx ρεδοουκτάση (TrxR) και στην NADPH οξειδάση και οδηγεί στην μεταμόρφωση του Trx από την ανενεργή οξειδωμένη μορφή του στην ενεργό μειωμένη μορφή του. Στη συνέχεια, η ενεργός μορφή του Trx χρησιμεύει ως μειωτικός παράγοντας για διάφορες ενδοθηλιακές υπεροξειδάσες, οι οποίες αποτελούν άλλα κυτταρικά αντιοξειδωτικά, καθώς και μεταγραφικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα έτσι να διατηρείται η οξειδωτική ομοιόσταση. Το οξειδωτικό στρες στο ενδοθήλιο μεσολαβείται κυρίως από τα Reactive Oxygen Species (ROS). Αν και τα φυσιολογικά επίπεδα των ROS είναι απαραίτητα για την αγγειογένεση, η υπερβολική παραγωγή ROS είναι γνωστό ότι προκαλεί

ισχαιμία και απόπτωση, ειδικά σε ασθενείς με καρδιαγγειακούς επιβαρυντικούς παράγοντες [201]. Έτσι λοιπόν το σύστημα Trx χρησιμεύει στο να ισορροπεί το σύστημα ROS στα επιθυμητά φυσιολογικά επίπεδα, με αποτέλεσμα την καλύτερη κυτταρική επιβίωση και λειτουργία και συνολικά θετική επίδραση στην αγγειογένεση μετά την εμβρυική ζωή. Για παράδειγμα σε μελέτη *in vitro* βρέθηκε ότι η υπερέκφραση του Trx συνδέεται με αυξημένη έκφραση του VEGF και του HIF-1α και κατά συνέπεια αγγειογένεση. Αντίθετα, η χορήγηση κυττάρων τα οποία δεν είναι ευαίσθητα στον Trx, έχει σαν αποτέλεσμα τη σημαντική βαθμού μείωση της έκφρασης του VEGF και του HIF-1 και άρα της αγγειογένεσης [202]. Το Trx σύστημα έχει δύο μορφές: την κυτταροπλασματική- πυρηνική μορφή (Trx-1) και την μιτοχονδριακή μορφή (Trx-2). Ο Trx-1 είναι η μορφή η οποία έχει καλύτερα μελετηθεί [203]. Το ενδοθήλιο των αγγείων έχει επίσης πολλαπλά συστήματα που παράγουν ROS συμπεριλαμβανομένων των NADPH οξειδασών και των οξειδασών των ξανθινών. Οι NADPH οξειδάσες είναι γνωστό ότι παράγουν τις περισσότερες ROS στην παθογένεση της καρδιαγγειακής νόσου [204].

Όπως αναφέρθηκε, οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το Trx σύστημα και ιδίως ο Trx-1 ενεργοποιούν την αγγειογένεση, περιλαμβάνουν τη μείωση των ROS, με αποτέλεσμα τη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής μετανάστευσης, με την ενεργοποίηση μιας ποικιλίας μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του HIF-1α. Ο Trx-1 είναι γνωστό επίσης ότι αναστέλλει την αποδόμηση του HIF-1 από τον pVHL, με αποτέλεσμα την έκφραση του VEGF και την περαιτέρω ενεργοποίηση προαγγειογενετικών παραγόντων όπως το μονοξείδιο του αζώτου [202].

Επιπλέον, στην παθολογική αγγειογένεση, η υπερέκφραση του Trx -1 σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα HIF-1α και αυξημένη έκφραση VEGF. Επίσης τα καρκινικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν τον Trx-1 εμφανίζουν μειωμένη επιβίωση καθώς και κακή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία [203, 205]. Τα μικρά μόρια PX-12 και πλευροτίνη, αναστέλλουν τον Trx-1 και αποτρέπουν την έκφραση του HIF-1α κάτω από συνθήκες υποξίας, και με αυτόν τον τρόπο σχετίζονται με μειωμένη έκφραση του VEGF [206]. Αρκετά πειραματικά μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να διερευνηθεί πιθανή χρησιμότητα του Trx-1 στην επαγωγή της αγγειογένεσης στο καρδιαγγειακό σύστημα. Για παράδειγμα, η χορήγηση Trx-1 μέσω αδενοϊού στο μυοκάρδιο διαβητικών ποντικών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αγγειογένεσης [207]. Τα ανωτέρω δείχνουν ότι το σύστημα του Trx θα μπορούσε να αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο στην θεραπεία των ισχαιμικών παθήσεων. Ωστόσο απαιτούνται κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους ώστε να διερευνηθεί η χρησιμότητά τους στις καρδιαγγειακές παθήσεις.

- **Οδός PGC-1α**

Ο PGC-1α είναι μια πρωτεΐνη που αποτελεί έναν μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή που βρίσκεται άφθονος στα μιτοχόνδρια και είναι γνωστό ότι ρυθμίζει τις μεταβολικές λειτουργίες κατά την άσκηση, σε συνθήκες απουσίας επαρκούς ποσότητας οξυγόνου ή μεταβολικών παραγόντων, ενώ επίσης ενεργοποιεί την έκφραση του VEGF και την αγγειογένεση [208, 209]. Επιπλέον, ο PGC- 1α επάγει ισχυρά άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο PDGFB και ο Ang-2 σε καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων [210] και σε ποντίκια τα οποία έχουν έλλειψη του PGC-1α [209]. Επιπλέον, ποντίκια ομοζυγωτικά στην

έλλειψη του PGC-1α δεν μπορούν να αποκαταστήσουν φυσιολογική αιματική ροή μετά την ισχαιμία των άκρων, κάτι το οποίο αντιστρέφεται μέσω της διαγονιδιακής έκφρασης του PGC-1α [208]. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο PGC-1α επάγει την έκφραση του VEGF και την αγγειογένεση είναι αβέβαιος. Διάφορες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να διερευνηθεί. Σε μία από αυτές, σε μοντέλο ποντικών με ισχαιμία των οπισθίων άκρων, ο Arany και οι συνεργάτες του [208] έδειξαν ότι ο μηχανισμός επαγωγής της έκφρασης του VEGF από τον PGC-1α δεν εξαρτάται από την κλασική οδό απάντησης στην υποξία, η οποία ρυθμίζεται από τον HIF. Αντίθετα η έρευνα έδειξε ότι ο PGC-1α ενεργοποιεί ένα ξεχωριστό πυρηνικό υποδοχέα τον ER α (Estrogen Related Receptor – α) ο οποίος βρίσκεται στον επαγωγέα και σε έναν πρόσφατα ανακαλυφθέντα ενισχυτή (enhancer) στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου του VEGF [208]. Έτσι κατέληξαν ότι ο PGC-1α και ο ER α ελέγχουν μια νέα αγγειογενετική οδό, η οποία είναι ανεξάρτητη από τον HIF και παρέχει το απαραίτητο οξυγόνο και τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες κατά την ισχαιμία. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι ο PGC-1α έχει μείζονα ρόλο στη ρύθμιση της αγγειογένεσης σε μύες ως απάντηση σε ισχαιμική προσβολή. Εκτός από την παθολογική ισχαιμία, ο PGC-1α παίζει ρόλο και στην αγγειογένεση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η έκφραση του PGC-1α επάγεται ισχυρά από την άσκηση σε αρουραίους και ανθρώπους ενώ επίσης ο PGC-1α είναι ένας ισχυρός επαγωγέας τόσο της μιτοχονδριακής βιογένεσης όσο και της αγγειογένεσης στους σκελετικούς μύες [211]. Σε πρόσφατη *in vitro* μελέτη φάνηκε ότι ο HIF-2 α είναι ένας μείζων στόχος του PGC-1α στους σκελετικούς μύες και η οδός αυτή ενεργοποιείται από την άσκηση και την αύξηση του β -αδρενεργικού

τόνου. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι ο PGC-1α μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη βελτίωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, η οποία είναι συχνά μειωμένη σε ασθενείς με περιφερική αρτηριοπάθεια [212]. Ωστόσο, εξαιτίας της περιορισμένης έκτασης των κλινικών μελετών είναι αρκετά πρόωμο να προβλέψει κανείς τον ακριβή ρόλο που μπορεί να παίξει ο PGC- 1α στην θεραπευτική αγγειογένεση.

- **Μικρο- RNA και ολιγο-νουκλεοτίδια**

Τα μικρο- RNA (miRNAs) είναι ομάδες 22 νουκλεοτιδίων μη κωδικοποιού RNA που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στοχεύοντας το μεταγραφικό RNA (mRNA), προκειμένου να προκαλέσουν την κατάτμηση ή την αναστολή της μετάφρασης αυτού[213]. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τα miRNAs συμβάλλουν στις ισχαιμικές βλάβες και στις βλάβες επαναιμάτωσης, τροποποιώντας στοιχεία τα οποία σχετίζονται με την αγγείωση. Αυτά τα δεδομένα τα καθιστούν συνεπώς πιθανούς στόχους για αναστολή ή προαγωγή της θεραπευτικής αγγειογένεσης. Για παράδειγμα το miRNA-92α το οποίο είναι τμήμα μιας ομάδας miRNA εμπλέκεται στη διαδικασία της αναστολής της αγγειογένεσης [214, 215]. Σε πειραματικό μοντέλο η εξαναγκασμένη υπερέκφραση του miR-92a σε ενδοθηλιακά κύτταρα προκάλεσε αναστολή της αγγειογένεσης τόσο in vitro όσο και in vivo. Εκτιμάται ότι ο miR-92a δρα μέσω επιρροής στην έκφραση των ιντεγκρινών, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση. Η αναστολή της έκφρασης των ιντεγκρινών έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, που οδηγεί σε φλεγμονή, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και απόπτωση. Σε μοντέλα ποντικών με καρδιακή και περιφερική ισχαιμία η θεραπευτική αναστολή του miR-92a οδήγησε στην αύξηση της

πυκνότητας των αγγείων στον κατεστραμμένο ιστό και στη βελτίωση της λειτουργικής αποκατάστασης [214]. Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η έκφραση του HIF-1α αυξάνεται σε καταστάσεις ισχαιμίας σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα οποία έχει μεταφερθεί ο miR-424 οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση του VEGF, του μεταφορέα της γλυκόζης 1 (GLUT-1), της ερυθροποιητίνης (EPO), και στην αύξηση της αγγειογένεσης [216]. Στην ίδια μελέτη, παρόμοια ευρήματα βρέθηκαν και σε μοντέλο ισχαιμίας άκρων ποντικού. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα του miR-92a μειώθηκαν σημαντικά σε αυτό το μοντέλο, κάτι που υπερτονίζει το ρόλο του miR-424 στην επαγωγή της αγγειογένεσης. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο miR-424 επάγει την έκφραση του HIF-1α είναι η αναστολή της μετάφρασης του mRNA της κουλίνης 2 (CUL-2). Το CUL-2 μόριο είναι γνωστό ότι έχει κρίσιμο ρόλο στην σύνθεση του συστήματος της E3 ουμπικουιτινικής λιγάσης, με συνέπεια την πρωτεολυτική αποδόμηση του HIF1α [217]. Ο ρόλος των συγκεκριμένων oligo-νουκλεοτιδίων σε ανθρώπους δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, τα ανωτέρω αποτελέσματα, ωστόσο, δείχνουν τη σημασία τους και το ρόλο που μπορεί να παίξουν στην θεραπευτική αγγειογένεση σε περιφερική αγγειοπάθεια.

iii. Τα κύτταρα ως παράγοντες στη θεραπευτική αγγειογένεση

Οι θεραπείες οι οποίες βασίζονται σε κύτταρα αποτελούν μια ελκυστική προσέγγιση, η οποία έχει τη δυναμική να χρησιμοποιηθεί στη θεραπευτική αγγειογένεση. Υπάρχουν τόσο πειραματικά, όσο και κλινικά δεδομένα σε περιφερική αρτηριοπάθεια που έχουν δείξει τη δυνατότητα μεταμόσχευσης είτε αυτόλογων είτε αλλογενών κυττάρων. Μερικές από τις κυτταρικές πηγές, οι οποίες βρίσκονται υπό έρευνα,

περιλαμβάνουν τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (EPCs), τα κύτταρα του μυελού των οστών (BNCs), τα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα (MSCs), τα προγονικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από λιποκύτταρα (ADSCs), τα ανθρώπινα εμβρυονικά προγονικά κύτταρα (hESC) και τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (iPSCs). Ακολουθεί ανάλυση με τα πειραματικά και κλινικά δεδομένα για κάθε μια από τις ανωτέρω κυτταρικές πηγές.

- **Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (EPCs)**

Οι Asahara οι συνεργάτες, ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι η ενδοθηλιογένεση είναι εφικτή μέσω των EPCs του περιφερικού αίματος [33]. Περαιτέρω έρευνα απέδειξε ότι τα EPCs είναι ανώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν CD34 υποδοχείς καθώς και υποδοχείς VEGFR2. Τα EPCs είναι γνωστό ότι κινητοποιούν το μυελό των οστών και εκκινούν τη μεθεμβρυϊκή ενδοθηλιογένεση. Τουλάχιστον τέσσερις πηγές EPCs έχουν αναγνωρισθεί: τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, μυελοειδή κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, αρχέγονα κύτταρα τα οποία κυκλοφορούν στην περιφερική κυκλοφορία, καθώς και ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην περιφερική κυκλοφορία [218].

Γενικά τα EPCs είναι μονοπύρρηνα κύτταρα, τα οποία προέρχονται από το μυελό των οστών, κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα και προσκολλώνται σε μόρια του στρώματος, όπως η ινονεκτίνη, εκφράζοντας διακετυλική χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) και UEA-1 λεκτίνη [33]. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη διαφωνίες όσον αφορά τον ακριβή ορισμό των EPCs, δεδομένου ότι τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα εκφράζουν τόσο τους CD34, όσο και τους CD133 υποδοχείς. Η σύγχυση αυτή πηγάζει από το γεγονός ότι δεν έχουν γίνει

συγκεκριμένες έρευνες, οι οποίες θα καθορίσουν τα ακριβή μόρια τα οποία χαρακτηρίζουν ένα ώριμο έναντι ενός ανώριμου EPC. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν πρόσφατες προτάσεις ότι τα αληθή EPCs δεν εκφράζουν τους υποδοχείς CD133 κάτι που τα διαφοροποιεί πιθανότατα από τα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα. Υπάρχουν δύο χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τα EPCs από τα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs): τα EPCs έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται in vivo και να σχηματίζουν νέα αγγεία, ενώ τα ECs βρίσκονται στην κυκλοφορία, είναι δεσμευμένα, δεν έχουν τη δυνατότητα να διαιρεθούν και μειώνονται με το χρόνο. Η πιθανή σχέση που θα μπορούσαν να έχουν με την αγγειογένεση τα ECs ακόμη διερευνάται. Σε μοντέλα ισχαιμίας οπίσθιων άκρων σε ζώα, η μεταμόσχευση EPCs έχει δείξει κάποιο όφελος στη νεοαγγείωση [219, 220]. Επειδή τα κυκλοφορούντα EPCs είναι σπάνια σε αριθμό, ορισμένες μελέτες έχουν προσπαθήσει να διεγείρουν την απελευθέρωσή τους από το μυελό των οστών, χρησιμοποιώντας τον αυξητικό παράγοντα των κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων (GM-CSF).

Η μελέτη START (διέγερση της αρτηριογένεσης με την υποδόρια χορήγηση GM-CSF ως νέα μέθοδος θεραπείας της περιφερικής αρτηριοπάθειας), διερεύνησε τη χρήση του GM-CSF σε ασθενείς με περιφερική αρτηριοπάθεια. Η μελέτη ωστόσο δεν έδειξε όφελος στην ομάδα των ασθενών που χορηγήθηκε GM-CSF έναντι της ομάδας μάρτυρα. Δεν φάνηκαν διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες στην 14η και στην 90η μέρα ούτε στην απόσταση που μπορούσαν να περπατήσουν οι ασθενείς, ούτε στο χρόνο που μπορούσαν να περπατήσουν ή στο σφυροβραχιόνιο δείκτη. Η μικροκυκλοφορία όπως μετρήθηκε με λέιζερ Doppler perfusion ήταν μειωμένη στην ομάδα

μάρτυρα, αλλά δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις ομάδες όπου χορηγήθηκε ο GM-CSF σε ποικίλη δοσολογία [221].

Πρόσφατες έρευνες έχουν εστιάσει στη χρήση των EPCs, τα οποία πιστεύεται ότι είναι πλούσια σε υποδοχείς CD34 ή CD133. Για παράδειγμα, σε μια φάσης I / II μελέτη οι Kawamoto και συνεργάτες, μελέτησαν την ασφάλεια της αυτόλογης ενδομυϊκής έγχυσης κυττάρων κινητοποιημένων μέσω GM-CSF σε ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία εξ αιτίας αθηροσκλήρωσης [222]. Τα κύτταρα, τα οποία ήταν πλούσια σε υποδοχείς CD34, κινητοποιήθηκαν αρχικά από τον μυελό των οστών, στη συνέχεια απομονώθηκαν από την περιφερική κυκλοφορία, καλλιεργήθηκαν και μεταμοσχεύτηκαν σε 17 ασθενείς σε διάφορες αυξανόμενες σταδιακά δόσεις, χωρίς ωστόσο να υπάρχει ομάδα μάρτυρας. Στις 12 εβδομάδες μετά τη χορήγηση, φάνηκαν οφέλη τόσο στους πρωτογενείς στόχους που ήταν ο δακτυλοβραχιόνιος δείκτης, η κλίμακα άλγους και η συνολική απόσταση που μπορούσαν να περπατήσουν οι ασθενείς, όσο και στους δευτερεύοντες στόχους (παρενέργειες, επούλωση των ελκών και μετρήσεις της αγγείωσης). Παρόλα αυτά, αυτή η μελέτη δεν είναι τυχαιοποιημένη και δεν υπάρχει ομάδα μάρτυρας. Μια μεγαλύτερη φάσης III μελέτη απαιτείται ώστε να διερευνηθεί η πιθανότητα τα ευρήματα αυτής της μελέτης να οφείλονται σε δράση placebo.

Με παρόμοιο τρόπο σε μια μελέτη φάσης I οι Bert και συνεργάτες, εκτίμησαν τη δυνατότητα αυτόλογης ενδομυϊκής μεταμόσχευσης EPCs πλούσιων σε CD133 υποδοχείς σε ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία [223]. Ο πρωτεύον στόχος της έρευνας ήταν η επιβίωση χωρίς ακρωτηριασμό στους 12 μήνες, ενώ οι δευτερεύοντες στόχοι ήταν η ανακούφιση από τον πόνο, ο σχηματισμός νέων

παράπλευρων αγγείων και η ποιότητα ζωής. Στους 12 μήνες παρακολούθησης, η έγχυση αυτών των προγονικών κυττάρων προστάτεψε από τον ακρωτηριασμό 7 από τους 9 ασθενείς. Επίσης 7 ασθενείς έδειξαν βελτίωση ως προς την ποιότητα ζωής και την απόσταση που μπορούσαν να περπατήσουν χωρίς να πονέσουν. Εντούτοις, φάνηκε βελτίωση στους 3 και 6 μήνες αλλά όχι στους 12 μήνες στο συνολικό performance score. Μια μεγάλη τυχαίοποιημένη μελέτη είναι απαραίτητη, ειδικά για να γίνει σύγκριση και των διαφόρων αυτών πληθυσμών EPCs μεταξύ τους, αλλά και να φανεί τελικά η αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία της περιφερικής αρτηριοπάθειας.

- **Κύτταρα του μυελού των οστών (BMCs)**

Όπως υποδηλώνει το όνομά τους, τα κύτταρα του μυελού των οστών προέρχονται από το μυελό των οστών και μπορεί να είναι είτε μη επεξεργασμένα, μη κλασματοποιημένα, είτε μονοπύρηνια κύτταρα, τα οποία έχουν διαχωριστεί μεταξύ τους με φυγοκέντρηση [224]. Τα BMCs είναι αποθήκες κυττάρων, τα οποία χρησιμεύουν ως προγονικά κύτταρα σε διάφορα επίπεδα ωριμότητας και με διάφορες δυνατότητες διαφοροποίησης. Το πιο σημαντικό είναι ότι τα BMCs περιέχουν αρχέγονα κύτταρα, προγονικά κύτταρα, καθώς και HSCs, MSCs, αιμαγγειοβλάστες και EPCs [225]. Μελέτες οι οποίες έχουν γίνει σε πειραματόζωα, έχουν δείξει ότι η μεταμόσχευση BMCs βελτιώνει τη νεοαγγείωση σε ισχαιμικά οπίσθια άκρα. Το 2002 έγιναν οι πρώτες κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους με μεταμόσχευση BMCs για τη θεραπεία της περιφερικής αρτηριοπάθειας [226, 227].

Σε μια πρόσφατη φάσης II τυχαίοποιημένη διπλή - τυφλή μελέτη η οποία ονομάστηκε PROVASA, οι Wolter και συνεργάτες, υπέθεσαν

ότι η ενδοαρτηριακή έγχυση μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών (BM-MNCs) σχετίζεται με βελτιωμένη αιμάτωση των άκρων, όπως αυτή μετράται με το σφυροβραχιόνιο δείκτη (πρωτεύων στόχος της έρευνας) και με μείωση του ισχαιμικού πόνου ηρεμίας και βελτίωση της επούλωσης των ελκών (δευτερεύοντες στόχοι της μελέτης) [228]. Η μελέτη αυτή χρησιμοποίησε μια πρωτοποριακή μέθοδο που ονομάζεται randomized-start clinical trial design

Σε αυτή τη μελέτη 40 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν ένας προς ένα και είτε έλαβαν ενδοαρτηριακή έγχυση αυτόλογων BM-MNCs κυττάρων είτε placebo. Στο τέλος των 3 μηνών, η ομάδα που είχε λάβει αρχικά μάρτυρα έλαβε πραγματική θεραπεία, οπότε χορηγήθηκε σε αυτό το χρονικό σημείο η πρώτη δόση BMCs. Στους 3 μήνες οι ασθενείς οι οποίοι αρχικά είχαν λάβει BM-MNCs έλαβαν δεύτερη δόση θεραπείας. Στους 6 μήνες παρακολούθησης έγινε σύγκριση ανάμεσα στις δύο ομάδες και οι ασθενείς που είχαν ακόμη σοβαρά έλκη (κατηγορία Rutherford 5) έλαβαν επιπλέον θεραπεία, δηλαδή μια τρίτη δόση οι ασθενείς οι οποίοι αρχικά είχαν κατηγοριοποιηθεί στην ενεργή ομάδα, ή μια δεύτερη δόση αυτοί που είχαν λάβει placebo. Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να εκτιμήσει κατά πόσο οι επαναλαμβανόμενες θεραπείες με αυτόλογα BMCs μπορεί να είναι επωφελείς συγκριτικά με τη μία δόση, όπως είχε γίνει σε προηγούμενες μελέτες. Η μελέτη έδειξε ασφάλεια και επιβεβαιώθηκαν οι δευτερεύοντες στόχοι, όχι όμως ο πρωτεύων στόχος.

Η χορήγηση αυτόλογων κυττάρων μυελού των οστών σε ασθενείς με περιφερική αρτηριοπάθεια, οι οποίοι έπασχαν από κρίσιμη ισχαιμία, μελετήθηκε με μια φάσης II έρευνα [229]. Η μελέτη αυτή είναι προοπτική, τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή, η οποία συγκρίνει την

ενδομυϊκή έγχυση καλλιεργημένων αυτόλογων BMCs, τα οποία ονομάστηκαν tissue repair cells (TRCs) σε ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία συγκριτικά με placebo. Η μελέτη αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη και μια πρώτη εκτίμηση δημοσιεύτηκε πρόσφατα. Ένα σύνολο 46 ασθενών, οι οποίοι δεν ήταν τυφλοί ως προς τη θεραπεία που έλαβαν, χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την ενδιάμεση ανάλυση. Από αυτά τα 46 άτομα, τα 33 συμπλήρωσαν 12 μήνες παρακολούθησης, και άλλα 13 συμπλήρωσαν τουλάχιστον 6 μήνες παρακολούθησης. Στη συνέχεια τυχαιοποιήθηκαν και έλαβαν είτε TRCs είτε placebo (TRCs 32 άτομα, ομάδα μάρτυρας 14 άτομα). Κατά την παρακολούθηση 0, 3 και 7 μέρες καθώς και 3, 6,9 και 12 μήνες μετά τη θεραπεία δε φάνηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον πρωτεύοντα στόχο, ο οποίος ήταν η ασφάλεια, ανάμεσα στις δύο ομάδες. Ωστόσο, υπήρξε όφελος στους δευτερεύοντες στόχους που ήταν η επιβίωση χωρίς σοβαρό ακρωτηριασμό και ο χρόνος μέχρι την αποτυχία της θεραπείας, η οποία αποτυχία ορίζεται ως μείζων ακρωτηριασμός, θάνατος, νέα γάγγραινα ή διπλασιασμός του μεγέθους του έλκους. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη στην οποία έγινε σύγκριση με μάρτυρα της αυτόλογης χορήγησης αρχέγονων κυττάρων και καλλιεργημένων BM-MNCs για τη θεραπεία της κρίσιμης ισχαιμίας. Σημαντικοί ήταν και οι επιτευχθέντες δευτερεύοντες στόχοι αυτής της θεραπείας, οι οποίοι είναι σημαντικοί κλινικά στόχοι, όπως ο χρόνος χωρίς ακρωτηριασμό. Παρόλα αυτά, χρειάζεται μια μεγαλύτερη φάσης III μελέτη για να επιβεβαιωθούν τα ανωτέρω ευρήματα.

Σε μια άλλη ανάλυση φάσης I, ο Ideai και οι συνεργάτες του εκτίμησαν τα μακροχρόνια κλινικά αποτελέσματα μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση BM-MNCs σε ασθενείς με κρίσιμη ισχαιμία [230].

Ειδικότερα, θέλησαν να συγκρίνουν τα αποτελέσματα σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση, ως την αιτία της κρίσιμης ισχαιμίας (N=25) έναντι ασθενών με νόσο Buerger (N=26). Χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες 46 ασθενείς από τους οποίους 30 είχαν αθηροσκλήρωση και 16 νόσο Buerger. Στην παρακολούθηση μετά από 4 χρόνια φάνηκε όφελος στους πρωτεύοντες στόχους (επιβίωση χωρίς μείζονα ακρωτηριασμό, συνολική θνητότητα) στις ομάδες οι οποίες έλαβαν θεραπεία. Η επιβίωση χωρίς μείζονα ακρωτηριασμό στην ομάδα που έλαβε θεραπεία ήταν 48% σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση και 95% σε ασθενείς με νόσο Buerger συγκριτικά με 0% στην ομάδα μάρτυρας ασθενών με αθηροσκλήρωση και 6% στην ομάδα μάρτυρας ασθενών με νόσο Buerger. Η συνολική επιβίωση ήταν 76% στην ομάδα ασθενών με αθηροσκλήρωση που έλαβαν θεραπεία και 100% στην ομάδα ασθενών με νόσο Buerger που έλαβαν θεραπεία, ενώ ήταν 67% στην ομάδα μάρτυρα ασθενών με αθηροσκλήρωση και 100% στην ομάδα μάρτυρα ασθενών με νόσο Buerger. Επιπλέον, στην ομάδα ασθενών με νόσο Buerger υπήρξε σημαντική βελτίωση στους δευτερεύοντες στόχους της μελέτης (σφυροβραχιόνιος δείκτης και διαδερμική πίεση οξυγόνου – TcPO₂) στον 1 μήνα και στα 3 χρόνια μετά τη θεραπεία. Αντίθετα, στην ομάδα ασθενών με αθηροσκλήρωση, η βελτίωση του σφυροβραχιονίου δείκτη και του TcPO₂ διήρκησε μόνο 1 μήνα. Η μελέτη αυτή προσφέρει ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις στη σύγκριση της ανταπόκρισης στη θεραπεία με BM-MNC ανάμεσα σε διαφορετικές παθήσεις που προκαλούν κρίσιμη ισχαιμία. Ωστόσο, είναι μια μη τυχαιοποιημένη μελέτη και υπόκειται σε προκατάληψη επιλογής. Οι ασθενείς με νόσο Buerger, οι οποίοι βρίσκονταν στην ομάδα θεραπείας, παρακινήθηκαν να σταματήσουν το κάπνισμα πριν ξεκινήσει η θεραπεία, ενώ αντίθετα

στην ομάδα μάρτυρας δεν απαγορεύτηκε το κάπνισμα. Φαίνεται επίσης ότι τα άτομα που συμπεριλήφθηκαν στην ομάδα θεραπείας είχαν λιγότερο σοβαρή νόσο συγκριτικά με την ομάδα μάρτυρας, στην οποία η πλειοψηφία ήταν υποψήφιοι για μείζονα ακρωτηριασμό. Επιπλέον οι ασθενείς με νόσο Buerger ήταν συνήθως νέοι (< 50 χρονών), με λιγότερους επιβαρυντικούς παράγοντες που προδιαθέτουν σε αθηροσκλήρωση, εκτός από το κάπνισμα, και γι' αυτό το λόγο η λειτουργία των αρχέγονων κυττάρων του νωτιαίου μυελού τους είναι καλύτερη, ενώ έχουν και καλύτερη πρόγνωση με την αποφυγή του καπνίσματος. Όλα τα ανωτέρω ζητήματα καθιστούν την αξιολόγηση των ευρημάτων της έρευνας δυσχερή.

Μια άλλη μελέτη η οποία αξίζει να αναφερθεί είναι η MESEND0 Trial, η οποία βρίσκεται αυτή τη στιγμή σε εξέλιξη. Πρόκειται για μια φάσης II μελέτη, η οποία εκτιμά την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της χορήγησης αναμειγμένων αρχέγονων κυττάρων από τον μυελό των οστών στην θεραπεία της κρίσιμης ισχαιμίας. Στη συγκεκριμένη μελέτη ασθενείς με αμφοτερόπλευρη διαλείπουσα χωλότητα χωρίζονται με μη τυχαιοποιημένο τρόπο σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα λαμβάνει υποδόριες εγχύσεις με συνδυασμό αυτόλογων BMCs, ενώ η δεύτερη ομάδα λαμβάνει έγχυση placebo. Ο πρωτεύων στόχος της έρευνας είναι η μέτρηση της βελτίωσης στο σχηματισμό νέων αγγείων μετά από 4 μήνες, όπως απεικονίζεται με πυρηνική μέτρηση της αιμάτωσης (perfusion scan), ενώ ο δευτερεύων στόχος είναι η μέτρηση της ασφάλειας και η βελτίωση του πόνου ηρεμίας με τη χρήση οπτικής αναλογικής κλίμακας[54].

Αν και η χρησιμοποίηση των BMCs στη θεραπεία της περιφερικής αρτηριοπάθειας έχει δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ο μηχανισμός

της δράσης των BMCs στην επαγωγή της αγγειακής αναγέννησης, παραμένει διφορούμενος. Ο ενοφθαλμισμός μέσα στο τοπικό ενδοθήλιο, έναντι της υπόθεσης για παρακρινική δράση, συνεχίζει να συζητείται. Κάποιοι ερευνητές, οι οποίοι μελετούν την αναγέννηση του μυοκαρδίου, υποστηρίζουν την υπόθεση του ενοφθαλμισμού [231, 232]. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις ο μηχανισμός αυτός έχει αμφισβητηθεί [233]. Έτσι η παρακρινής δραστηριότητα έχει προταθεί ότι είναι απαραίτητη για τη συμπλήρωση της μυοκαρδιακής επιδιόρθωσης [234]. Περαιτέρω έρευνες χρειάζονται για να διασαφηνιστούν οι ανωτέρω αντικρουόμενες απόψεις.

Η πλειοψηφία των μελετών που έχουν γίνει για την διερεύνηση της δράσης των αρχέγονων κυττάρων στην περιφερική αρτηριοπάθεια, δείχνουν μεγάλο βαθμό δράση του placebo. Κάποιοι λόγοι που θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτό το φαινόμενο συμπεριλαμβάνουν τα παρακάτω:

- Δεν είναι πλήρως κατανοητή η διαδικασία της θεραπευτικής αγγειογένεσης στο σύνολό της.
- Υπάρχει ανάγκη να βελτιωθούν οι τεχνικές χαρακτηρισμού και απομόνωσης συγκεκριμένων κυττάρων και κυτοκινών, οι οποίες σχετίζονται με τη νεοαγγειογένεση.
- Είναι απαραίτητο να τυποποιηθούν η ιδανική δόση και η οδός χορήγησης.
- Υπάρχει ανάγκη να βελτιστοποιηθούν οι μέθοδοι αξιολόγησης των κλινικών δοκιμών.
- Δεν είναι πλήρως καθορισμένη η δυνατότητα των φυσικώς δρώντων μηχανισμών αποκατάστασης- αγγειογένεσης

Επιπλέον, η πλειοψηφία αυτών των κλινικών δοκιμών είναι φάσης I και φάσης II και περισσότερες τυχαιοποιημένες διπλές- τυφλές μελέτες φάσης III χρειάζονται για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα κάθε κυτταρικής μεθόδου. Επίσης, οι μελέτες φάσης III θα πρέπει να συμπεριλάβουν συνδυασμό θεραπειών, καθώς και χρήση λιγότερο επεμβατικών μεθόδων χορήγησης, όπως είναι η ενδομυϊκή έγχυση, σε αντίθεση με τις πιο επεμβατικές ενδοαγγειακές οδούς. Οι στόχοι των εν λόγω δοκιμών θα πρέπει επίσης να τυποποιηθούν. Για παράδειγμα, η βελτίωση των αιμοδυναμικών και των λειτουργικών παραμέτρων, σαν πρωτεύοντες στόχοι, παραμένουν αντικρουόμενες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τέτοιες παράμετροι όπως ο σφυροβραχιόνιος δείκτης, το TcPO₂, η πυρηνική αιμάτωση και η αγγειογραφία μπορεί να μην είναι πλήρως αξιόπιστες και επηρεάζονται από το χειριστή. Για παράδειγμα, ο σφυροβραχιόνιος δείκτης μπορεί να είναι αναξιόπιστος σε ασθενείς με διαβήτη, νεφρική ανεπάρκεια ή μεγάλη ηλικία, καθώς οι αρτηρίες είναι συχνά αποτιτανωμένες και άρα μη συμπίεσιμες. Εξάλλου τα αποτελέσματα της εν λόγω δοκιμασίας μπορούν να εξαρτηθούν από το μέγεθος της περιχειρίδας που χρησιμοποιείται και το σωματότυπο. Το πάχος του δέρματος, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος και η συστηματική αρτηριακή πίεση, μπορούν επίσης να επηρεάσουν τις μετρήσεις TcPO₂. Η αξιολόγηση των αγγειογραφικών ευρημάτων πολλές φορές απαιτεί περισσότερους από έναν διαγνώστη, είναι εξαρτώμενη από αυτόν, και επίσης εξαρτάται από το συγχρονισμό της έγχυσης του σκιαγραφικού. Οι μετρήσεις της πυρηνικής αιμάτωσης μπορούν επίσης να είναι αναξιόπιστες ανάλογα με την ποσότητα των ισότοπων που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικούς χρόνους. Οι μετρήσεις λειτουργικότητας, όπως ο χρόνος που μπορεί να περπατήσει

κάποιος, επίσης δεν είναι πάντα αξιόπιστες. Ο χρόνος βάρδιας περιορίζεται από την υποκειμενικότητα που οφείλεται στην παρεμβολή του ασθενούς. Επιπρόσθετα, το να εκτιμήσει κανείς την αμφοτερόπλευρη διαλείπουσα χωλότητα μπορεί να είναι μεγάλη πρόκληση, καθώς πολλές φορές είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ποιο από τα δύο άκρα προκαλεί τα συμπτώματα. Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιούν σαν πρωτεύοντες στόχους τον μείζονα ακρωτηριασμό, την επιβίωση χωρίς ακρωτηριασμό και τον θάνατο, τα οποία πιστεύεται ότι είναι πιο ισχυρά στοιχεία και επηρεάζονται σε μικρότερο βαθμό από τη δράση του placebo.

- **Μεσεγχυματικά αρχέγονα κύτταρα (MSCs)**

Τα μεσεγχυματικά αρχέγονα κύτταρα (MSCs) προέρχονται από τον μυελό των οστών και δεν είναι αιμοποιητικά κύτταρα στη φύση τους. Τα MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε άλλα κύτταρα, όπως οστεοβλάστες, μυοβλάστες, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα [235]. Δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι δείκτες για τα MSCs. Παρόλα αυτά, γενικώς, αναγνωρίζεται ότι τα MSCs εκφράζουν κυρίως τους CD90, CD105, CD44, και Stro-1 δείκτες και τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1, αλλά όχι αιμοποιητικούς δείκτες όπως οι CD34, CD14, CD45, και CD11 [236]. Τα MSCs έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον ως πηγές κυττάρων για θεραπεία της σοβαρής ισχαιμικής νόσου [237-239]. Τα MSCs έχουν αρκετά πλεονεκτήματα:

- Είναι εύκολο να απομονωθούν από το μυελό των οστών και να καλλιεργηθούν *ex vivo* σε αρκετά μεγάλα ποσά.
- Έχουν χαμηλή ανοσογονικότητα και έτσι υπάρχει δυνατότητα να τροποποιηθούν προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση, χωρίς να υπάρχει ανάγκη ανοσοκαταστολής.

➤ Μπορεί να τροποποιηθούν με ένα μικρό φορέα ώστε να μεταφέρουν συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία συμμετέχουν στη νεοαγγείωση.

➤ Μπορούν να χορηγηθούν συστηματικά ή τοπικά χωρίς να έχουν σημαντικές παρενέργειες.

Ο μηχανισμός δράσης των MSCs για τη νεοαγγείωση παραμένει αντικρουόμενος. Θεωρείται από πολλούς ότι δρουν μέσω της απελευθέρωσης κυτοκινών, οι οποίες έχουν παρακρινική ή απομακρυσμένη επίδραση στους ιστούς και έχουν ως αποτέλεσμα τη διέγερση των ενδογενών ενδοθηλιακών κυττάρων ώστε να μεταναστεύσουν, να διαφοροποιηθούν και να πολλαπλασιαστούν, αντικαθιστώντας έτσι τα μειωμένα τοπικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Υπάρχουν πολλαπλές μελέτες σε πειραματόζωα, οι οποίες δείχνουν οφέλη από τη μεταμόσχευση MSCs σε ισχαιμικές καταστάσεις. Η πρώτη μελέτη με MSCs πραγματοποιήθηκε το 1995, όταν αυτόλογα MSCs χορηγήθηκαν σε ανθρώπους. Το 2002 έγινε η πρώτη έγχυση αλλογενών MSCs σε ανθρώπους [240, 241]. Περιορισμένα δεδομένα υπάρχουν όσον αφορά την χρήση των MSCs σαν μονοθεραπεία για την αντιμετώπιση της περιφερικής αρτηριοπάθειας. Οι περισσότερες μελέτες έως τώρα έχουν χρησιμοποιήσει συνδυασμό κυτταρικών θεραπειών: EPCs μαζί με MSCs ή MNCs με MSCs. Για παράδειγμα σε μια μελέτη φάσης I οι Lasala και συνεργάτες, μελέτησαν τη χρησιμότητα της ενδοαρτηριακής έγχυσης μιας μείξης από αυτόλογα MSCs σε συνδυασμό με MNCs στη θεραπεία της κρίσιμης ισχαιμίας σε 10 διαβητικούς ασθενείς (στάδια Fontaine 2B- 4) [242]. Στους 10 μήνες παρακολούθησης παρατηρήθηκε βελτίωση στον πρωτεύοντα στόχο (ασφάλεια και εφαρμογή της θεραπείας), καθώς και στους

δευτερεύοντες στόχους (πόνος ηρεμίας, ανοχή στην άσκηση, σφυροβραχιόνιος δείκτης, TcPO₂ και δημιουργία παράπλευρων αρτηριών). Είναι προφανές ότι αυτή είναι μη τυχαιοποιημένη μελέτη και δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Περαιτέρω τυχαιοποιημένες μελέτες είναι απαραίτητες. Παρόλα αυτά, κάποιες τεχνικές παράμετροι όσον αφορά στην χορήγηση και την προετοιμασία των κυττάρων πρέπει να βελτιωθούν ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της μεταμόσχευσης των κυττάρων. Είναι πιθανό ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων φτάνει στην περιοχή της ισχαιμίας λόγω φτωχής μετανάστευσης, ενοφθαλμισμού και επιβίωσης των μεταμοσχευθέντων κυττάρων. Με τη συνεχή πρόοδο στις τεχνικές κυτταρικής επιλογής και τροποποίησης, το μέλλον της χρησιμοποίησης των MSCs σαν θεραπευτικής μεθόδου για την περιφερική αρτηριοπάθεια, φαίνεται ακόμη πιο λαμπρό.

- **Αρχέγονα κύτταρα προερχόμενα από το λιπώδη ιστό (ADSCs)**

Η χορήγηση αυτόλογου λιπώδους ιστού είναι μια ανερχόμενη πηγή αρχέγονων κυττάρων για θεραπευτική χρήση σε ισχαιμική νόσο. Ο λιπώδης ιστός αποτελείται κυρίως από δύο κατηγορίες κυττάρων: τα ώριμα λιποκύτταρα, (mature adipocytes - MA), τα οποία σχηματίζουν το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του λιπώδους ιστού, και τα στρωματικά κύτταρα τα οποία συχνά ονομάζονται και στρωματικό αγγειακό τμήμα (SVF) [243]. Έχει αποδειχθεί ότι το SVF περιέχει μεσεγχυματικά αρχέγονα και προγονικά κύτταρα, με δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε διάφορες κυτταρικές σειρές, όπως μυοκύτταρα, λιποκύτταρα, ινοβλάστες, οστεοβλάστες και χονδροβλάστες [244, 245]. Τα MSCs περιέχονται στο λιπώδη ιστό και συχνά τα αποκαλούμε αρχέγονα/πρόγονα κύτταρα που προέρχονται από τον λιπώδη ιστό

(ADSCs ή ASCs) ή αναγεννητικά κύτταρα που προέρχονται από το λιπώδη ιστό (ADRCs) κι έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τον τραυματισμένο ιστό [243].

Σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμικών οπίσθιων άκρων έχει φανεί ότι η μεταμόσχευση ADSCs αυξάνει την αγγειογένεση [246, 247]. Δεν υπάρχουν, προς το παρόν, κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους για την μελέτη της νεοαγγείωσης σε ασθενείς με περιφερική αρτηριοπάθεια, αλλά υπάρχουν κλινικές δοκιμές, οι οποίες εμπλέκουν τα λιποκύτταρα και τα καρδιακά προγονικά κύτταρα στη θεραπεία των καρδιακών νοσημάτων [248, 249]. Όπως στις περισσότερες θεραπείες που βασίζονται σε κύτταρα, ο μηχανισμός δράσης των ADSCs στην νεοαγγείωση δεν είναι καλά κατανοητός. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα ADSCs δεν έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα ή προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως αρχικά υποστηρίχτηκε. Μπορούν όμως να διαφοροποιηθούν σε λεία μυϊκά κύτταρα και περικύτταρα [250]. Όπως θα περίμενε κανείς, η μεταμόσχευση ADSCs επηρεάζει τη θεραπευτική αγγειογένεση μέσω της έκκρισης προ-αγγειογενετικών χημοκινών και κυτοκινών όπως ο SDF-1, ο VEGF και ο HGF [246, 251]. Συγκεκριμένα, η χημοκίνη SDF-1 θεωρείται ότι παίζει τον κρισιμότερο ρόλο στην αγγειογένεση που προκαλείται από τα ADSCs [246].

Ένα από τα πλεονεκτήματα των ADSCs είναι ότι μπορούν να απομονωθούν μέσω ελάχιστα επεμβατικών πράξεων όπως η λιποαναρρόφηση ή η εκτομή υποδορίου λίπους, και στη συνέχεια να καλλιεργηθούν *ex vivo*. Αν και τα ADSCs είναι μια φτηνή και εύκολα προσβάσιμη πηγή για αρχέγονα κύτταρα για θεραπευτική αγγειογένεση, πριν χρησιμοποιηθούν σε ρουτίνα χρειάζονται

περαιτέρω μελέτες. Είναι σημαντικό να καθοριστεί η ποσότητα των ADSCs που πρέπει να μεταμοσχευθεί, καθώς και η πιθανώς μειωμένη απάντηση στη μεταμόσχευση αυτόλογων ADSCs σε ασθενείς με συνοδές καταστάσεις, όπως ο διαβήτης, η υπέρταση, η προχωρημένη ηλικία και το κάπνισμα, παράγοντες οι οποίοι όλοι είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τον αριθμό και τη λειτουργία των κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων [252, 253].

- **Ανθρώπινα εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα (hESCs)**

Τα hESCs είναι πολυδύναμα κύτταρα, τα οποία προέρχονται από τα εσωτερικά κύτταρα της βλαστοκύστης ενός εμβρύου και είναι ικανά να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε κάθε κυτταρική σειρά, που συντίθεται από ένα από τα τρία βλαστικά στρώματα, δηλαδή το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα. Τα μοναδικά αυτά χαρακτηριστικά τους, καθιστούν τα hESCs μια εξαιρετική πηγή κυττάρων για θεραπευτική αγγειογένεση. Έχει αποδειχτεί ότι τα hESCs μπορούν να κατευθυνθούν στο να διαφοροποιηθούν σε καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα *ex vivo* [254, 255]. Συγκεκριμένα, τα hESCs μπορούν να οδηγηθούν στην έκφραση του ενδοθηλιακού δείκτη CD31, να εκφράσουν μόρια προσκόλλησης, όπως το PECAM, το οποίο το συναντάται στα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, να εκφράσουν τον παράγοντα Von Willbrand (vWF), καθώς και να εμφανίσουν ενδοθηλιακές λειτουργίες, όπως είναι η πρόσληψη ακετυλιωμένης LDL και ο σχηματισμός τριχοειδικών σωληναρίων σε Matrigel [256].

Σε μελέτη σε πειραματόζωα παρατηρήθηκε επιτυχής διάσωση του άκρου σε ποντίκια στα οποία μεταμοσχεύτηκε hESCs μετά από

απολίνωση της μηριαίας αρτηρίας [257]. Η χρήση των hESCs στη θεραπευτική αγγειογένεση, προκειμένου να δοκιμαστεί σε ανθρώπους θα πρέπει να αντιπαρέλθει ορισμένες αντικρουόμενες απόψεις. Κατ' αρχήν, υπάρχουν ηθικά ζητήματα που αφορούν τη χρήση ανθρώπινων εμβρύων κάτι που οδήγησε το FDA στις ΗΠΑ να απαγορεύσει την εκτεταμένη χρήση των hESCs. Επιπλέον, υπάρχει περιορισμένη γνώση για τις μακροχρόνιες επιδράσεις της μεταμόσχευσης hESCs σε ανθρώπους. Υπάρχουν φόβοι ανάμεσα στους ειδικούς ότι η χορήγηση των hESCs θα μπορούσε να έχει ανεπιθύμητες ενέργειες όπως διαφοροποίηση σε τεράτωμα [258]. Τέλος, οι τεχνικές προκλήσεις της αλλογενούς χρήσης των hESCs θα πρέπει επίσης να ξεπεραστούν.

- **Επαγόμενα πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα (iPSCs)**

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα είναι τα μόνα κύτταρα τα οποία είναι ικανά να διαφοροποιούνται σε διάφορες συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Ωστόσο αυτό έχει επαναπροσδιοριστεί από την ανάπτυξη των iPSCs. Η ιδέα ότι πλήρως διαφοροποιημένα ενήλικα κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν *in vitro* μέσω της εισαγωγής μεταγραφικών παραγόντων, που επάγουν τα σωματικά κύτταρα στην έκφραση γενετικών χαρακτηριστικών εμβρυικών αρχέγονων κυττάρων, έχει φέρει επανάσταση στην προοπτική της χρήσης των αρχέγονων κυττάρων ως θεραπευτική μέθοδο για τις ισχαιμικές παθήσεις.

Οι Takahashi και συνεργάτες, δημοσίευσαν ένα πρωτοποριακό πείραμα το 2006 δείχνοντας ότι η μεταγωγή τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων κλειδιά (OCT3-4, SOX2, c-MYC και Klf4), σε πυρήνες ενήλικων ινοβλαστών από ποντίκια δημιούργησε αρχέγονα κύτταρα, τα οποία ήταν ικανά να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα και των τριών

γενετικών στρωμάτων [259]. Έκτοτε, τα iPSCs έχουν δημιουργηθεί και από ανθρώπινους ινοβλάστες χρησιμοποιώντας διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες [260] με ειδικά για ασθένειες προφίλ [261]. Η ανάπτυξη που παρέχεται από τα iPSCs δημιουργεί πολλά υποσχόμενες εναλλακτικές λύσεις για τις θεραπείες επαναγγείωσης στην περιφερική αρτηριοπάθεια. Μέχρι σήμερα τα iPSCs έχουν προγραμματιστεί *in vitro* σε καρδιομυοκύτταρα, αγγειακά τοιχωματικά κύτταρα και αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα [262, 263]. Χρησιμοποιώντας πειραματικό μοντέλο με ποντίκια, ο Suzuki και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα Fnk-1 που προέρχονται από iPSCs μπορούν να επάγουν την αγγειογένεση σε ισχαιμικά άκρα, αυξάνοντας προσωρινά τη συγκέντρωση του VEGF και ενσωματώνοντας άμεσα ενδοθηλιακά κύτταρα στον ισχαιμικό ιστό [264]. Αν και η πρώτη κλινική μελέτη σε ανθρώπους για τη χρήση εμβρυικών αρχέγονων κυττάρων εγκρίθηκε το 2010 για ασθενείς με τραυματισμούς του νωτιαίου μυελού, λόγω αναστολών που αφορούν την ασφάλεια δεν υπάρχουν αυτή τη στιγμή κλινικές μελέτες για ισχαιμικές παθήσεις με τη χρήση iPSCs με στόχο την θεραπευτική αγγειογένεση.

Υπάρχουν αρκετά πιθανά οφέλη σχετικά με τη χρήση iPSCs στην αγγειακή αναγέννηση. Η χρήση των iPSCs αν και έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτή των hESCs έχει το πλεονέκτημα ότι δεν περιλαμβάνει λήψη κυτταρικών στοιχείων από το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Επιπλέον η παροχή iPSCs είναι άφθονη σε όλα τα άτομα κι έτσι μπορούν εύκολα να συλλεχθούν με μη επεμβατικό τρόπο. Άρα, είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν αυτόλογα iPSCs εξαλείφοντας την ανάγκη για ανοσοκαταστολή κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η τεχνολογία των

iPSCs θα μπορούσε να εξελιχθεί στο να είναι ειδική για κάθε ασθενή, μπαίνοντας έτσι στο πεδίο της προσωποποιημένης ιατρικής.

Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο το αν τα iPSCs θα μπορούσαν να αποτελέσουν την ιδανική λύση για τα άτομα που χρειάζονται αρχέγονα κύτταρα για θεραπεία από ισχαιμικές παθήσεις. Υπάρχει πιθανότητα ότι τμήματα του DNA των iPSCs μπορεί να συσσωρεύσουν γενετικά λάθη κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού τους. Για παράδειγμα, εάν η ενσωμάτωση του ρετροϊού γίνει αιτία να προκληθούν μεταλλάξεις σε περιοχές υπεύθυνες για τον κυτταρικό κύκλο ή την καταστολή των όγκων, ογκογονίδια μπορεί να δημιουργηθούν, οδηγώντας σε καρκινογένεση. Ένα άλλο πιθανό πρόβλημα μπορεί να προκύψει εάν τα κύτταρα αποτύχουν να διαφοροποιηθούν καταλλήλως μετά τη μεταμόσχευση με συνέπεια να αναπτυχθούν τερατώματα ή τερατοκαρκινώματα από την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων σε μη προβλέψιμους ρυθμούς. Είναι επίσης πιθανό ότι μη υγιείς δότες μπορεί να έχουν δυσλειτουργικά iPSCs, κάτι που θα μπορούσε να προκαλέσει περαιτέρω βλάβη στους δέκτες, οι οποίοι χρειάζονται ενεργοποίηση των αρχέγονων κυττάρων. Εξαιτίας των ανωτέρω, η ασφάλεια της χορήγησης iPSCs στους ανθρώπους απαιτεί πρώτα την ανάπτυξη μιας λεπτομερούς διαγνωστικής διαδικασίας για να καθοριστεί εάν τα κύτταρα είναι ασφαλή για εμφύτευση. Συνολικά, περαιτέρω έρευνες απαιτούνται για το πώς είναι δυνατόν να γίνει άμεση επαγωγή των iPSCs σε ενδοθηλιακά κύτταρα και για το πώς θα διασφαλιστεί ότι αυτά τα κύτταρα είναι πλήρως επαναπρογραμματισμένα και άρα ασφαλή για εμφύτευση. Τότε μόνο θα καταστεί δυνατή η χρήση των iPSCs για θεραπευτική αγγειογένεση.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Επιστημονικός σκοπός

Ο NGF έχει φανεί σε προηγούμενες μελέτες ότι διαθέτει αγγειογενετική δράση. Ο επιστημονικός σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο μεγάλου πειραματόζωου, σε αντιδιαστολή με τα ποντίκια στ οποία έχουν γίνει οι μέχρι τώρα μελέτες, της αγγειογενετικής δράσης του νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF). Απώτερος στόχος είναι η δυνατότητα για μελλοντική χρήση του NGF σε ασθενείς με περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια, για την επαναγγείωση των άκρων.

Πιο συγκεκριμένα η έρευνα αποσκοπεί στην μελέτη των εξής επιστημονικών ερωτημάτων:

- 1) Πόσο σημαντική είναι η αγγειογενετική δράση του NGF σε μοντέλο χρόνιας ισχαιμίας οπίσθιων άκρων κονίκλων Νέας Ζηλανδίας; Βελτιώνει ο NGF την αγγείωση των άκρων;
- 2) Η δράση του NGF επηρεάζει τη δημιουργία μεγάλων αγγείων (αρτηριογένεση)?
- 3) Με ποιο μηχανισμό προκαλεί την αγγειογενετική του δράση ο NGF και συγκεκριμένα μέσω ποιων υποδοχέων.

A. Υλικά και μέθοδος

1. Σχεδιασμός του πειραματικού πρωτοκόλλου

Το *in vivo* πειραματικό πρωτόκολλο σχεδιάστηκε λαμβάνοντας υπ' όψιν τις διεθνείς οδηγίες για την φροντίδα και τη χρήση

πειραματόζωων (Guide for the care the Care and Use of Laboratory Animals) δημοσιευμένες από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) και εγκρίθηκε από την Επιστημονική επιτροπή καθώς και την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών.

Η μελέτη συμπεριέλαβε 34 αρσενικούς λευκούς κονίκλους Νέας Ζηλανδίας (*Oryctolagus cuniculus*), ηλικίας περίπου 6 μηνών και μέσου βάρους 3 κιλών (εύρος 2.7- 3.4 κιλά). Προκλήθηκε ισχαιμία σε αμφότερα τα οπίσθια άκρα των κονίκλων με την χρήση ενδοαγγειακών μεθόδων (εμβολισμός με μεταλλικά σπειράματα), και στη συνέχεια χορηγήθηκαν στο ένα από τα άκρα οι υπό έλεγχο ουσίες. Στο άλλο άκρο κάθε πειραματόζωου χορηγήθηκαν μόνο οι διαλύτες των δραστικών ουσιών και αποτέλεσε το άκρο σύγκρισης (εσωτερικός μάρτυρας). Τα πειραματόζωα κατανεμήθηκαν, ανάλογα με τις υπό έλεγχο ουσίες, σε 6 ομάδες ως εξής:

1) Ομάδα μελέτης του NGF αποτελούμενη από 11 πειραματόζωα (n=11). Η ομάδα αυτή αποτέλεσε το βασικό κορμό του πειράματος και χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η επίδραση του NGF στην επαναγγείωση του άκρου.

2) Ομάδα μελέτης του K252a, αναστολέα του TrkA, αποτελούμενη από 4 πειραματόζωα (n=4). Η συγκεκριμένη ομάδα χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί ο ρόλος του TrkA στην ενδογενή αγγειογένεση

3) Ομάδα μελέτης του SU5416, αναστολέα του υποδοχέα 2 του VEGF, αποτελούμενη από 4 πειραματόζωα (n=4). Αντίστοιχα, η ομάδα αυτή χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί ο ρόλος του VEGFR-2 στην ενδογενή αγγειογένεση

4) Ομάδα μελέτης του συνδυασμού του K252a με τον NGF, αποτελούμενη από 5 πειραματόζωα (n=5).

5) Ομάδα μελέτης του συνδυασμού του SU5416 με τον NGF, αποτελούμενη από 5 πειραματόζωα (n=5). Οι ομάδες 4 και 5 στις οποίες συνδυάστηκε ο NGF με τους αναστολείς των υποδοχέων του NGF και του VEGF, αποσκοπούσαν στη διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου ο NGF επάγει την αγγειογένεση.

6) Ομάδα μελέτης της θρομβίνης, αποτελούμενη από 5 πειραματόζωα (n=5). Η ομάδα αυτή αποτέλεσε τον θετικό μάρτυρα για τη μελέτη, προκειμένου να συγκριθεί η δράση του NGF με αυτή της θρομβίνης, δεδομένου ότι έχει βρεθεί σε προηγούμενες μελέτες στο ίδιο πειραματικό μοντέλο ότι η θρομβίνη επάγει την αγγειογένεση [166].

Η αιμάτωση των κάτω άκρων των πειραματόζωων μελετήθηκε 40 ημέρες μετά τον εμβολισμό, προκειμένου να δοθεί αρκετός χρόνος για τη δημιουργία και ανάπτυξη παράπλευρου αρτηριακού δικτύου [265]. Η μελέτη έγινε με ενδοαρτηριακή αγγειογραφία, αξονική τομογραφία αιμάτωσης (CT Perfusion) και ιστολογική εξέταση. Ακολουθεί αναλυτική παρουσίαση των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν.

2. Τεχνική πειραματικού πρωτοκόλλου

i. Διαωτιαία πρόσβαση

Η τεχνική της διαωτιαίας πρόσβασης αποτελεί μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδο προσπέλασης του αγγειακού δικτύου των κονίκλων, η οποία έχει περιγραφεί στο παρελθόν [266]. Στόχος της είναι η πρόσβαση στο αρτηριακό δίκτυο, όπως στην προκειμένη περίπτωση, ή

στο φλεβικό δίκτυο για άλλα πειράματα, μέσω των αγγείων του ωτός του πειραματόζωου, χωρίς να χρειάζεται οποιαδήποτε χειρουργική παρέμβαση. Η τεχνική αυτή συνεπάγεται μικρότερη νοσηρότητα και θνητότητα για τα πειραματόζωα και συγκεκριμένα:

- Μειώνεται ο χρόνος της επέμβασης και κατ' επέκταση ο χρόνος αναισθησίας. Έτσι μειώνεται η ποσότητα των αναλγητικών και αναισθητικών φαρμάκων που χρειάζεται να χορηγηθούν και οι πιθανές επιπλοκές αυτών.

- Μειώνεται η απώλεια αίματος στο ελάχιστο, καθώς δεν υπάρχει χειρουργική τομή.

- Η απουσία χειρουργικής τομής συνεπάγεται και μικρότερη ένταση πόνου του πειραματόζωου κατά την επέμβαση, με αποτέλεσμα να μην είναι απαραίτητη η χρήση γενικής αναισθησίας .

- Δεν είναι απαραίτητη η γνώση χειρουργικών τεχνικών απολίνωσης αγγείων και έτσι η επέμβαση μπορεί να πραγματοποιηθεί από έναν επεμβατικό ακτινολόγο και έναν βοηθό που δεν έχει μεγάλη εμπειρία σε πειραματικά πρωτόκολλα.

Η διαδικασία της μεθόδου έχει ως εξής:

Το κουνέλι αναισθητοποιείται με ενδομυϊκή χορήγηση ξυλαζίδης (10mg/kg) και κεταμίνης (50mg/kg) (διαχωριστική αναισθησία). Σε περίπτωση που η διάρκεια του πειράματος είναι μεγάλη, υπάρχει δυνατότητα χορήγησης προποφόλης ενδοφλεβίως, μετά από καθετηριασμό μίας εκ των ωτιαίων φλεβών. Εντούτοις στο συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο δεν χρειάστηκε να χορηγηθεί προποφόλη σε καμία περίπτωση.

Το πειραματόζωο στη συνέχεια ακινητοποιείται σε ειδικά σχεδιασμένο ξύλινο νάρθηκα σχήματος Χ, κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα

πρόσθια και οπίσθια άκρα του να βρίσκονται σε πλήρη έκταση. Ο ξύλινος νάρθηκας τοποθετείται στην αγγειογραφική τράπεζα. Το κεφάλι του κουνελιού στρέφεται προς την αντίθετη πλευρά από το ους το οποίο πρόκειται να καθετηριαστεί. Το εν λόγω ους αποστειρώνεται με ιωδιούχο διάλυμα (ιωδιούχος ποβιδόνη 10%) και αλκοόλη. Ο συνδυασμός αυτός επιφέρει πέρα από την αποστείρωση, τοπική αγγειοδιαστολή για τον ευχερή καθετηριασμό.

Η υπόλοιπη επέμβαση γίνεται κάτω από ακτινοσκοπική καθοδήγηση. Στο πείραμα της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκε το ειδικό C-arm του πειραματικού εργαστηρίου (C-arm, SIREMOBIL 2000, Siemens, Germany), το οποίο διαθέτει δυνατότητα αφαιρετικής ψηφιακής αγγειογραφίας (digital subtraction angiography, DSA) και δυνατότητα χαρτογράφησης των αγγείων (roadmapping).

Η πρόσβαση γίνεται από την κεντρική ωτιαία αρτηρία με έναν καθετήρα φλεβοκέντησης 22G. Προτιμάται η αρχική παρακέντηση να γίνεται σχετικά περιφερικά στην αρτηρία, ώστε σε περίπτωση αποτυχίας και τραυματισμού της αρτηρίας να υπάρχει δυνατότητα επιπλέον προσπαθειών κεντρικότερα. Ο κεντρικός στυλεός αφαιρείται και εφόσον η παρακέντηση είναι επιτυχής παρατηρείται έντονη ροή αρτηριακού αίματος (Εικόνα 16).



Εικ 15. Η κεντρική ωτιαία αρτηρία απεικονίζεται να διανύει μία ευθεία πορεία επιφανειακά στο κέντρο του ωτός. Σημειώνονται στην περιφέρεια του ωτός μεγάλοι φλεβικοί κλάδοι, οι περιφερικές ωτιαίες φλέβες.



Εικ 16. Έντονη ροή αρτηριακού αίματος μετά την αφαίρεση του κεντρικού στυλεού.

Έπειτα εγχέονται 2-3ml ισότονου ισοωσμωτικού σκιαγραφικού (Visipaque 320mg) αραιωμένου σε αναλογία 1:1 με ηπαρινισμένο φυσιολογικό ορό, οπότε απεικονίζεται σε εικόνες roadmapping η ωτιαία αρτηρία, η σύστοιχη έξω καρωτίδα και το αορτικό τόξο (Εικόνα 17).



Εικ 17. Εικόνες roadmapping της έξω καρωτίδας και της ωτιαίας αρτηρίας, η οποία αποτελεί τον βασικό κλάδο της.

Ένα υδρόφιλο σύρμα οδηγός διαμέτρου 0.018inch (V18 Control wire, Boston Scientific, Natick, MA, USA) εισάγεται διαμέσου του φλεβοκαθετήρα και υπό ακτινοσκοπική καθοδήγηση προωθείται, μέσω

των εξωκρανιακών κλάδων της έξω καρωτίδας, στο αορτικό τόξο (Εικόνα 18).



Εικ 18. Προώθηση του σύρματος στην έξω καρωτίδα

Σε αυτό το σημείο, συνήθως, εφόσον το πειραματόζωο βρίσκεται τοποθετημένο σε επαρκή έκταση, είναι δυνατή άμεσα η προώθηση του σύρματος στην κατιούσα θωρακική αορτή και στη συνέχεια στην κοιλιακή αορτή και η τοποθέτηση του θηκαριού με το σύρμα σε αυτή τη θέση. Σε αντίθετη περίπτωση το σύρμα προωθείται στην αριστερή κοιλία και στη συνέχεια αφού τοποθετηθεί το θηκάρι, όπως θα περιγραφεί αμέσως μετά, χρησιμοποιείται ένας καθετήρας Cobra 1 4F

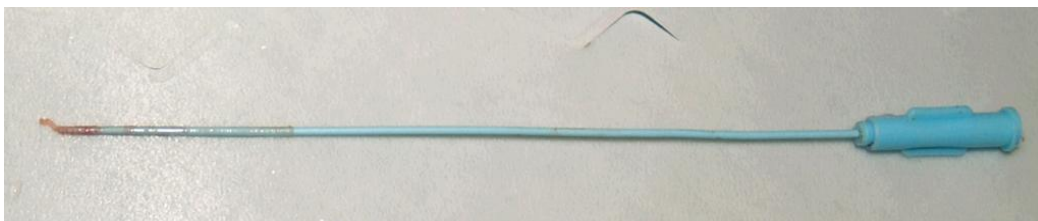
(Cobra 1 hydrophilic catheter 4F, Terumo, Tokyo, Japan) για τον καθετηριασμό της κατιούσας θωρακικής αορτής.

Το θηκάρι που χρησιμοποιείται για να καταστούν δυνατοί όλοι οι μετέπειτα χειρισμοί στο αρτηριακό δίκτυο είναι ένα θηκάρι εξωτερικής διαμέτρου 4F, το οποίο είναι συμβατό με σύρμα οδηγό 0.018inch (Boston Medical, Villers-les-Nancy, Γαλλία). Με το σύρμα να βρίσκεται, όπως προαναφέρθηκε είτε στην κοιλιακή αορτή, είτε στην αριστερή κοιλία, αφαιρείται προσεκτικά ο φλεβοκαθετήρας. Κατόπιν αφού χορηγηθεί τοπική αναισθησία με λιδοκαΐνη 1% (περίπου 1ml), διενεργείται επιμήκης τομή, κατά μήκος της κεντρικής ωτιαίας αρτηρίας, από το σημείο της παρακέντησης, έως κεντρικά στο ους. Σκοπός είναι να απελευθερωθεί το σύρμα που βρίσκεται στην ωτιαία αρτηρία από τους πέριξ ιστούς (Εικόνα 19).



Εικ 19. Τομή κατά μήκος της κεντρικής ωτιαίας αρτηρίας και καθαρισμός του σύρματος από τους πέριξ ιστούς

Μόλις επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιείται ο εσωτερικός εισαγωγέας του θηκαριού για να γίνουν διαστολές των περιφερικών αγγείων, με οδηγό το ήδη τοποθετημένο σύρμα. Οι διαστολές αυτές είναι καθοριστικής σημασίας, και για να θεωρηθούν επιτυχείς πρέπει να επιτευχθεί η αφαίρεση του ενδοθηλίου των περιφερικών αγγείων. Καθώς εισάγεται ο διαστολέας και στη συνέχεια αφαιρείται, γύρω από αυτόν αναγνωρίζεται τμήμα του ενδοθηλίου του αγγείου.



Εικ 20. Διαστολή με τον εισαγωγέα του θηκαριού, γύρω από τον οποίο φαίνεται το ενδοθήλιο που έχει αφαιρεθεί

Όταν έχει αφαιρεθεί επαρκώς το ενδοθήλιο παρατηρείται αθρόα ροή αίματος από τη βάση του ωτός, τη στιγμή που αφαιρείται ο

διαστολέας. Εφαρμόζεται άμεσα πίεση στο σημείο αυτό και αφού αφαιρεθεί το ενδοθήλιο από τον εισαγωγέα, αυτός επανατοποθετείται στο θηκάρι και ολόκληρο το θηκάρι προωθείται έως την έξω καρωτίδα. Η σωστή τοποθέτηση επιβεβαιώνεται με αναρρόφηση αίματος και εγχέεται ηπαρινισμένος ορός στο θηκάρι.



Εικ 21α Απεικόνιση της θέσης του θηκαριού αγγειογραφικά



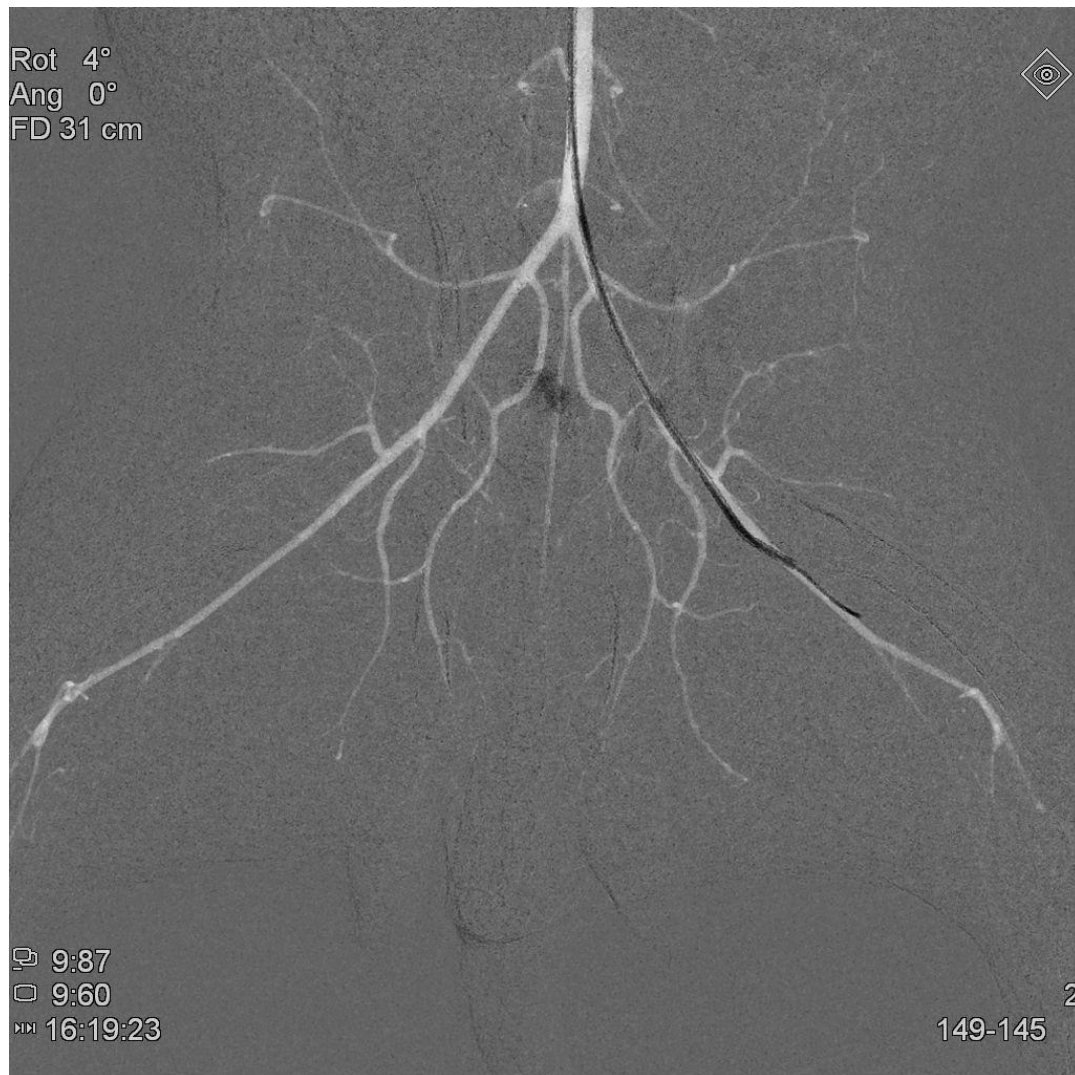
Εικ 21β. Απεικόνιση της εξωτερικής θέσης του θηκαριού

Μετά το πέρας των μετέπειτα ενδοαγγειακών χειρισμών, το θηκάρι αφαιρείται και ασκείται πίεση τοπικά για 10 λεπτά, ενώ στη συνέχεια τοποθετείται αιμοστατική πλαστική λαβίδα για την περαιτέρω πίεση του σημείου.

ii. Ενδοαγγειακός εμβολισμός κάτω άκρων

Ακολουθώντας τη διαδικασία της διαωτιαίας πρόσβασης, όπως περιγράφηκε ανωτέρω, το υδρόφιλο σύρμα 0.018inch καταλήγει στην κοιλιακή αορτή. Το σύρμα αυτό προωθείται μέχρι λίγο πριν το διχασμό της αορτής και ένας υδρόφιλος καθετήρας Vertebral 4F (Vertebral hydrophilic catheter 4F, Terumo, Tokyo, Japan) εισάγεται μέσω αυτού. Με τον καθετήρα να βρίσκεται 2εκ περίπου πριν το διχασμό, γίνεται έγχυση 3ml αραιωμένου σκιαγραφικού και λαμβάνονται εικόνες roadmapping των αγγείων αμφοτέρων των κάτω άκρων. Αυτές οι εικόνες αποτελούν τον οδηγό για να εμβολιστούν αμφότερες οι μηριαίες αρτηρίες σε όλο τους το μήκος, καθώς και οι εν τω βάθει μηριαίες αρτηρίες.

Έναν μαλακό υδρόφιλο σύρμα με γωνία 0.035inch (Terumo, Tokyo, Japan) εισάγεται μέσω του καθετήρα και προωθείται μέχρι το άπω τμήμα της επιπολής μηριαίας αρτηρίας του ενός άκρου. Με τη βοήθεια αυτού του σύρματος, προωθείται και ο υδρόφιλος καθετήρας σε αυτό το σημείο. Το σύρμα αφαιρείται και εισάγεται ένα μεταλλικό σπείραμα (coil) με ίνες FIB 4mm X 50mm. Το μεταλλικό σπείραμα τοποθετείται κατά μήκος του αγγείου με το ένα του άκρο στο άπω τμήμα της επιπολής μηριαίας αρτηρίας, προ της έκφυσης της σαφηνούς αρτηρίας και το εγγύς άκρο στην έκφυση της εν τω βάθει μηριαίας αρτηρίας. Αυτό το μεταλλικό σπείραμα λόγω της σχετικά μεγάλης διαμέτρου παραμένει ευθύ εντός του αγγείου (Εικόνα 22).

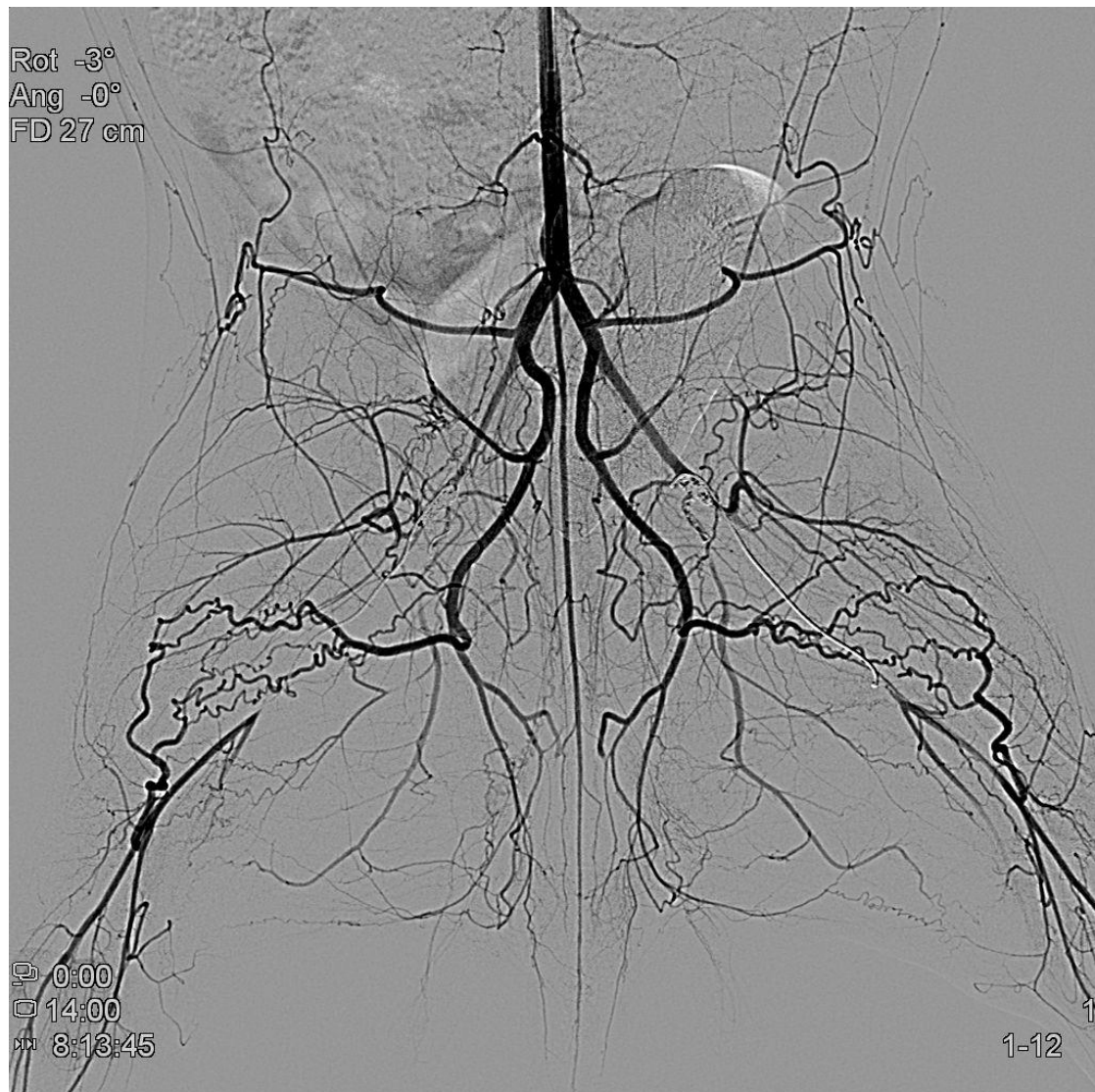


Εικ 22. Ο καθετήρας βρίσκεται εντός της μηριαίας αρτηρίας. Ανασύρεται σταδιακά και το μεταλλικό σπείραμα προωθείται εντός αυτής έως την έκφυση της σαφηνούς φλέβας

Κατά τη διάρκεια της τοποθέτησης του, ο καθετήρας ανασύρεται ως την έκφυση της εν τω βάθει μηριαίας αρτηρίας και στη συνέχεια ανασύρεται 1εκ περαιτέρω. Στο σημείο αυτό εισάγεται μικροκαθετήρας (Progreat, , Terumo, Tokyo, Japan) ο οποίος χρησιμοποιείται για να καθετηριαστεί η εν τω βάθει μηριαία αρτηρία. Αφού επιτευχθεί αυτό, αφαιρείται το σύρμα του μικροκαθετήρα και ενώ αυτός βρίσκεται στην έκφυση της εν τω βάθει μηριαίας αρτηρίας, ξεκινάει η τοποθέτηση 2

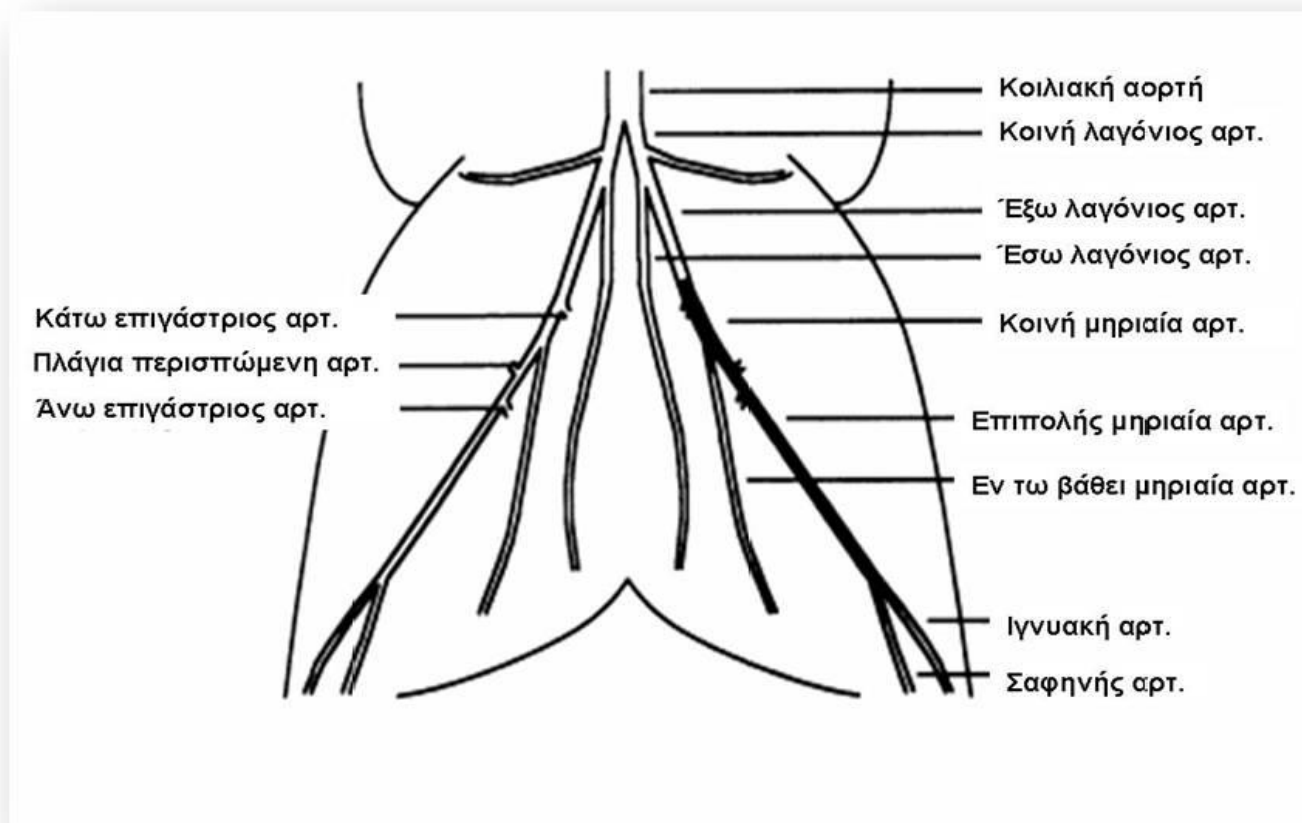
μεταλλικών σπειραμάτων SPI 3mm X 80mm. Ενώ τοποθετούνται αργά αυτά τα 2 μεταλλικά σπειράματα, ο μικροκαθετήρας ανασύρεται σταδιακά, έτσι ώστε τα μεταλλικά σπειράματα να διπλώσουν και να καταλήξει ένα μικρό τμήμα του πρώτου εντός της εν τω βάθει μηριαίας αρτηρίας και το υπόλοιπο εντός της κοινής μηριαίας αρτηρίας.

Εν συνεχεία αφαιρείται ο μικροκαθετήρας και ο υδρόφιλος καθετήρας ανασύρεται στην κοιλιακή αορτή. Χρησιμοποιώντας σαν οδηγό τις εικόνες road map των αγγείων των κάτω άκρων, που ελήφθησαν νωρίτερα, επαναλαμβάνεται η διαδικασία με τον ίδιο τρόπο για το άλλο άκρο. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία ο καθετήρας ανασύρεται εντός της κοιλιακής αορτής και 5 λεπτά αργότερα πραγματοποιείται αγγειογραφία των κάτω άκρων από αυτό το σημείο, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής απόφραξη αμφοτέρων των εν τω βάθει και επιπολής μηριαίων αρτηριών (Εικόνα 23). Για την αγγειογραφία αυτή εγχύονται 3ml αραιωμένου σκιαγραφικού και λαμβάνονται εικόνες με ρυθμό 1εικόνα/sec.



Εικ 23. Απεικονίζεται το FIB 4X50mm μεταλλικό σπείραμα σχετικά ευθύ εντός της επιπολής μηριαίας αρτηρίας και τα λεπτά 3X80mm σπειράματα με το αρχικό τους τμήμα εντός της εν τω βάθει μηριαίας αρτηρίας και τα υπόλοιπα διπλωμένα στην κοινή μηριαία αρτηρία. Κατά τον έλεγχο 5 λεπτά μετά τον εμβολισμό η δεξιά επιπολής και εν τω βάθει μηριαία αρτηρία και η αριστερή επιπολής μηριαία αρτηρία έχουν ήδη θρομβωθεί. Η αριστερή εν τω βάθει μηριαία αρτηρία, η οποία εμβολίστηκε τελευταία διατηρεί πολύ μικρή ροή, η οποία σύντομα θα διακοπεί εξ ολοκλήρου.

Τέλος αφαιρείται ο καθετήρας και στη συνέχεια το θηκάρι και ασκείται πίεση, όπως περιγράφηκε στην τεχνική της διαωτιαίας πρόσβασης για τον έλεγχο της αιμορραγίας.



Εικ 24. Ανατομία των αγγείων των κάτω άκρων των κονίκλων. Στο αριστερό άκρο απεικονίζονται με μαύρο χρώμα τα αγγεία που έχουν εμβολιστεί, δηλαδή η κοινή μηριαία αρτηρία, η έκφυση της εν τω βάθει μηριαίας και η επιπολής μηριαία.

iii. Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν

Νευρικός Αυξητικός Παράγοντας (Nerve Growth Factor, NGF)

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκε beta-NGF ποντικού (MB=26kDa). Η απομόνωση του NGF από σιελογόνους αδένες ποντικού, ο καθαρισμός (καθαρότητα δειγμάτων 87%), η λυοφιλοποίηση και η βιολογική αξιολόγησή του έγιναν από την ερευνητική ομάδα του Professor Philip Lazarovici (Department of Pharmacology, The Institute for Drug

Research, Faculty of Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, Israel), σε συνεργασία με την οποία έγινε η μελέτη. Η ξερή σκόνη NGF φυλασσόταν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Πριν την χορήγηση στα πειραματόζωα, ο NGF διαλυόταν σε ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση $100\mu\text{g/ml}$. Η αποστείρωση των διαλυμάτων NGF πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φίλτρων $0,2\mu\text{m}$ διαμέτρου.

K252a, ανταγωνιστής του υποδοχέα trkA του NGF

Για την αναστολή ενεργοποίησης του υποδοχέα trkA χρησιμοποιήθηκε ο φαρμακολογικός ανταγωνιστής K252a (8R*, 9S*, 11S*)-(i)-9-hydroxy-9-methoxycarbonyl-8-methyl-2,3,9,10-tetrahydro-8,11-epoxy-1H,8H,11H-2,7b,11a-triazadibenzo(a,g) cycloocta(c,d,e)trindene-1-one). Ο K252a είναι αλκαλοειδές που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Nocardiosis* (MB=467 gr/mol). Η απομόνωση του K252a, ο καθαρισμός (καθαρότητα δείγματος 99%), η λυοφιλοποίηση και η βιολογική αξιολόγησή του έγιναν από την ερευνητική ομάδα του Professor Philip Lazarovici. Αρχικά η ξερή σκόνη K252a διαλύθηκε σε διμέθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide, DMSO) και το διάλυμα φυλάχθηκε στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Πριν την χορήγηση στα πειραματόζωα, το διάλυμα K252a αραιωνόταν σε ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση $250\mu\text{g/ml}$.

SU-5416, ανταγωνιστής του υποδοχέα 2 του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, VEGFR2)

Για την αναστολή ενεργοποίησης του VEGFR2 χρησιμοποιήθηκε ο φαρμακολογικός ανταγωνιστής SU-5416 (3-[(2,4-dimethylpyrrol-5-yl)methylidanyl]-indolin-2-one). Η σύνθεση του SU-5416 (MB=238,3

gr/mol), ο καθαρισμός (καθαρότητα δείγματος 97%), η λυοφιλοποίηση και η βιολογική αξιολόγησή του έγιναν από την ερευνητική ομάδα του Professor Philip Lazaronici. Αρχικά η ξερή σκόνη SU-5416 διαλύθηκε σε διμέθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide, DMSO) και το διάλυμα φυλάχθηκε στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Πριν την χορήγηση στα πειραματόζωα, το διάλυμα SU-5416 αραιωνόταν σε ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 540 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Θρομβίνη

Στην μελέτη, ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε ετερόλογος θρομβίνη βοοειδούς, που είναι κλινικά διαθέσιμη (thrombin-JMI, King Pharmaceuticals Inc, Middleton, Temecula, CA). Η θρομβίνη διαλύθηκε και χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

iv. Χορήγηση των ουσιών που μελετήθηκαν

Η χορήγηση των υπό δοκιμή ουσιών έγινε 7, 14 και 20 ημέρες από την ημέρα του εμβολισμού. Οι κύριοι λόγοι που επιλέχτηκαν αυτά τα χρονικά διαστήματα ήταν οι εξής:

- Προσέγγιση κατά το δυνατό ενός μοντέλου υποξείας ισχαιμίας. Τα ίδια χρονικά διαστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί με αυτό τον στόχο σε παρόμοιες πειραματικές εργασίες στο παρελθόν[265].
- Οι 7 ημέρες που μεσολάβησαν από τον εμβολισμό έως την πρώτη ενδομυϊκή έγχυση ουσιών, δίνει τη δυνατότητα στα πειραματόζωα να αναρρώσουν από το στρες της οξείας ισχαιμίας και να μπορέσουν να ανεχθούν την αναισθησία, μειώνοντας έτσι τις απώλειες.

Για να γίνει η έγχυση οι κόνικλοι αναισθητοποιούνται με την ίδια τεχνική που αναφέρθηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια τυχαία

επιλέγεται το ένα από τα δύο κάτω άκρα, στο οποίο θα γίνει η ενδομυϊκή χορήγηση των υπό δοκιμή ουσιών. Η έσω επιφάνεια του μηρού τους αποστειρώνεται με αλκοολούχο διάλυμα. Ο συνολικός όγκος του χορηγούμενου διαλύματος διαιρείται σε ίσες ποσότητες και χορηγείται σε 3 σημεία του μηρού, ενδομυϊκά στους προσαγωγούς μύες, κατά μήκος της επιπολής μηριαίας αρτηρίας. Το πρώτο σημείο βρίσκεται στο ύψος της κοινής μηριαίας αρτηρίας, ενώ το τρίτο λίγο πριν το ύψος της άρθρωσης του γόνατος. Το δεύτερο σημείο βρίσκεται ενδιάμεσα από τα δύο αυτά σε ίσες περίπου αποστάσεις. Η βελόνα που χρησιμοποιείται είναι 22G και εισάγεται αρκετά βαθιά ώστε η έγχυση να γίνει ενδομυϊκώς και όχι υποδορίως.

Ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν τα πειραματόζωα στο ένα άκρο τυχαία χορηγήθηκε η υπό δοκιμή ουσία, ενώ στο άλλο άκρο ίση ποσότητα του διαλύτη της κάθε ουσίας. Η δόσεις που αναφέρονται είναι η συνολικές δόσεις σε κάθε ημέρα χορήγησης. Όπως αναφέρθηκε έγιναν 3 συνολικά εγχύσεις. Συγκεκριμένα:

1) Σε 11 πειραματόζωα χορηγήθηκαν 100μg NGF σε κάθε έγχυση, διαλυμένα σε NaCl 0.9%, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος του διαλύματος να είναι 1ml. Στο άλλο άκρο χορηγήθηκε 1ml NaCl 0.9%.

2) Σε 4 πειραματόζωα χορηγήθηκαν 240μg K252a, διαλυμένα σε DMSO 2,5%, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος του διαλύματος να είναι 1ml. Στο άλλο άκρο χορηγήθηκε 1ml DMSO 2,5%.

3) Σε 4 πειραματόζωα χορηγήθηκαν 540μg SU5416 διαλυμένα σε DMSO 2,5%, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος του διαλύματος να είναι 1ml. Στο άλλο άκρο χορηγήθηκε 1ml DMSO 2,5%.

4) Σε 5 πειραματόζωα χορηγήθηκαν συνδυασμός 240μg K252a διαλυμένα σε DMSO 2,5% και 100μg NGF διαλυμένα σε NaCl

0.9%. Σε αυτή την ομάδα χορηγήθηκε αρχικά ο αναστολέας και ο NGF χορηγήθηκε 1 ώρα μετά, προκειμένου να δοθεί αρκετός χρόνος στον αναστολέα να συνδεθεί με τους υποδοχείς του NGF. Στο ετερόπλευρο άκρο χορηγήθηκε 1ml DMSO 2,5% και στη συνέχεια μετά από 1 ώρα 1ml NaCl 0.9%.

5) Σε 5 πειραματόζωα χορηγήθηκαν συνδυασμός 540μg SU5416 διαλυμένα σε DMSO 2,5% και 100μg NGF διαλυμένα σε NaCl 0.9%. Και σε αυτή την ομάδα χορηγήθηκε αρχικά ο αναστολέας και ο NGF χορηγήθηκε 1 ώρα μετά, προκειμένου να δοθεί αρκετός χρόνος στον αναστολέα να συνδεθεί με τους υποδοχείς του NGF. Στο ετερόπλευρο άκρο χορηγήθηκε 1ml DMSO 2,5% και στη συνέχεια μετά από 1 ώρα 1ml NaCl 0.9%.

6) Σε 5 πειραματόζωα χορηγήθηκαν 5000 IU βόειος θρομβίνη σε κάθε έγχυση, διαλυμένα σε NaCl 0.9%, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος του διαλύματος να είναι 1ml. Στο ετερόπλευρο άκρο χορηγήθηκε 1ml NaCl 0.9%.

Ομάδα	Αριθμός κονίκλων	Χορηγηθείσα ουσία	Δόση	Διαλύτης
Ομάδα 1	11	NGF	100μg (x3)	NS 0.9%
Ομάδα 2	4	K252a (trkA inhibitor)	240μg (x3)	DMSO (2.5%)
Ομάδα 3	4	SU5416 (VEGFR2 inhibitor)	540μg (x3)	DMSO (2.5%)
Ομάδα 4	5	NGF + K252a	100μg+240μg (x3)	NS 0.9% + DMSO (2.5%)
Ομάδα 5	5	NGF + SU5416	100μg+540μg (x3)	NS 0.9% + DMSO (2.5%)
Ομάδα 6	5	Bovine Thrombin	5000 IU (x3)	NS 0.9%

Πίνακας 3: Σύνοψη των ομάδων του πειραματικού πρωτοκόλλου ανάλογα με τη χορηγηθείσα ουσία

3. Μελέτη της επαναγγείωσης

Η επαναγγείωση σε αμφότερα τα κάτω άκρα μελετήθηκε με δύο ακτινολογικές μεθόδους: αξονική τομογραφία αιμάτωσης (CT perfusion) και ψηφιακή αγγειογραφία. Και στις δύο τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος των ευρημάτων στο άκρο που έλαβε την μελετώμενη ουσία προς τα ευρήματα στο άκρο μάρτυρας. Αυτή η μέθοδος παρέχει σε κάθε πειραματόζωο εσωτερικό μάρτυρα, γεγονός που διασφαλίζει ότι τα αποτελέσματα δεν επηρεάζονται από τυχόν εξωγενείς παράγοντες, που αφορούν είτε τη γενική κατάσταση του

κονίκλου (αρτηριακή πίεση, σφύξεις), είτε τις μετρήσεις που έγιναν σχετικά με την επαναγγείωση.

Οι μετρήσεις και με τις δύο μεθόδους πραγματοποιήθηκαν την 40^η ημέρα μετά τον εμβολισμό και επομένως 20 ημέρες μετά την τελευταία EM χορήγηση ουσίας. Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν, καθώς και τα ευρήματα αναπτύσσονται στη συνέχεια.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα ευρήματα των ακτινολογικών μεθόδων, πραγματοποιήθηκε ιστολογική εκτίμηση της αγγειογένεσης και αρτηριογένεσης σε ορισμένα πειραματόζωα αμέσως μετά τη θανάτωσή τους την 40^η ημέρα.

i. Αξονική τομογραφία αιμάτωσης (CT Perfusion)

Η αξονική τομογραφία αιμάτωσης (CT perfusion) είναι μία μέθοδος, η οποία έχει πλέον καθιερωθεί τόσο στην κλινική πράξη όσο και σε ερευνητικά πρωτόκολλα [267, 268]. Αποτελεί μία από τις μεθόδους εκλογής για τη μελέτη της αγγειογένεσης, καθώς υπάρχουν εργασίες οι οποίες έχουν δείξει πολύ ικανοποιητική συσχέτιση των ευρημάτων αυτής της τεχνικής με τα ευρήματα της ιστολογικής εξέτασης [269, 270]. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται είναι η μεταφορά με τη ροή του αίματος του ακτινοσκιερού ιωδιούχου σκιαγραφικού στους ιστούς και η διήθηση των μορίων από τον ενδοαγγειακό στον εξωαγγειακό μεσοκυττάριο χώρο [271, 272]. Τα αγγεία τα οποία δημιουργούνται κατά την αγγειογένεση, αν και είναι πολύ μικρά για να διακριθούν με την απλή αξονική τομογραφία, είναι δυνατόν με τη συγκεκριμένη τεχνική να υπολογιστεί η πυκνότητά τους. Έτσι λοιπόν, η μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα μελέτης της ιστικής αιμάτωσης. Οι τιμές της αιματικής ροής (BF), του όγκου αίματος (BV),

του μέσου χρόνου διέλευσης (MTT) και του δείκτη διαπερατότητας (PS) υπολογίζονται με βάση ειδικά προγράμματα που παρέχονται πλέον από όλες τις εταιρίες κατασκευής αξονικών τομογράφων. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται με βάση συγκεκριμένα μαθηματικά μοντέλα [273]. Η λογική στην οποία βασίζεται η εξέταση είναι η λήψη επαναλαμβανόμενων εικόνων από ένα συγκεκριμένο σημείο με αποτέλεσμα να δίνεται η δυνατότητα μελέτης της συγκέντρωσης του σκιαγραφικού στο εν λόγω σημείο με την πάροδο του χρόνου.

Όπως προαναφέρθηκε οι μετρήσεις με την αξονική τομογραφία αιματώσεως πραγματοποιήθηκαν την 40^η ημέρα μετά τον εμβολισμό. Οι κόνικλοι αναισθητοποιήθηκαν με την προαναφερθείσα μέθοδο και μετά από τοπική αντισηψία καθετηριάστηκε με έναν φλεβοκαθετήρα 22G μία εκ των ωτιαίων φλεβών.

Το πειραματόζωο τοποθετήθηκε στο κρεβάτι του αξονικού τομογράφου σε ύπτια θέση και στη συνέχεια αμφότερα τα κάτω άκρα κάμφθηκαν και στερεώθηκαν κεκαμμένα με τη βοήθεια αυτοκόλλητης ταινίας και δύο ρολών χαρτιού, που τοποθετήθηκαν εκατέρωθεν του κόνικλου. Η κάμψη των άκρων έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε στις εγκάρσιες τομές του αξονικού τομογράφου σε κατάλληλο επίπεδο να απεικονίζονται ταυτόχρονα η κοιλιά στο ύψος της κοιλιακής αορτής και της κάτω κοίλης φλέβας και η προς μελέτη περιοχή, δηλαδή αμφότεροι οι μηροί.

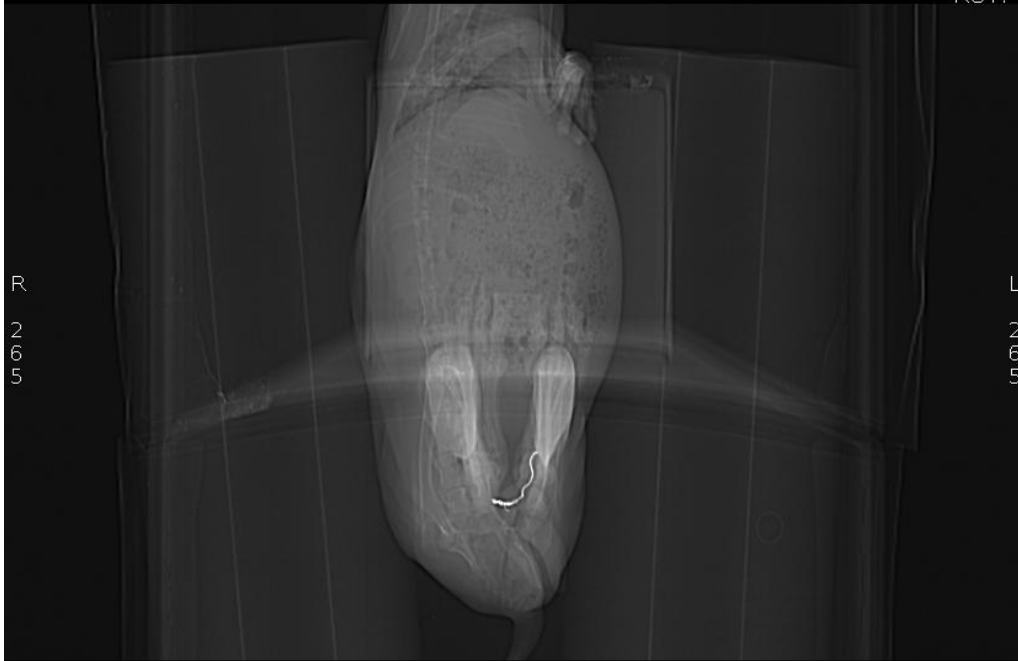
GE MEDICAL SYSTEMS
LightSpeed16 ct99
Ex: 38138
Se: 1 SCOUT
Im: 1
XY A30.00 Cor
DFOV 53.0cm

S 159

University Hospital of Patras
RABBIT GROUP A 16 DAY 10

38138
Jul 21 2008
10:23:06 PM
888 X 605

Mag = 1.00
FL:
ROT:



Εικ 25. Τοπόγραμμα από την αξονική τομογραφία, το οποίο απεικονίζει τον τρόπο με τον οποίο έχουν καμφθεί τα κάτω άκρα προς την κοιλιά

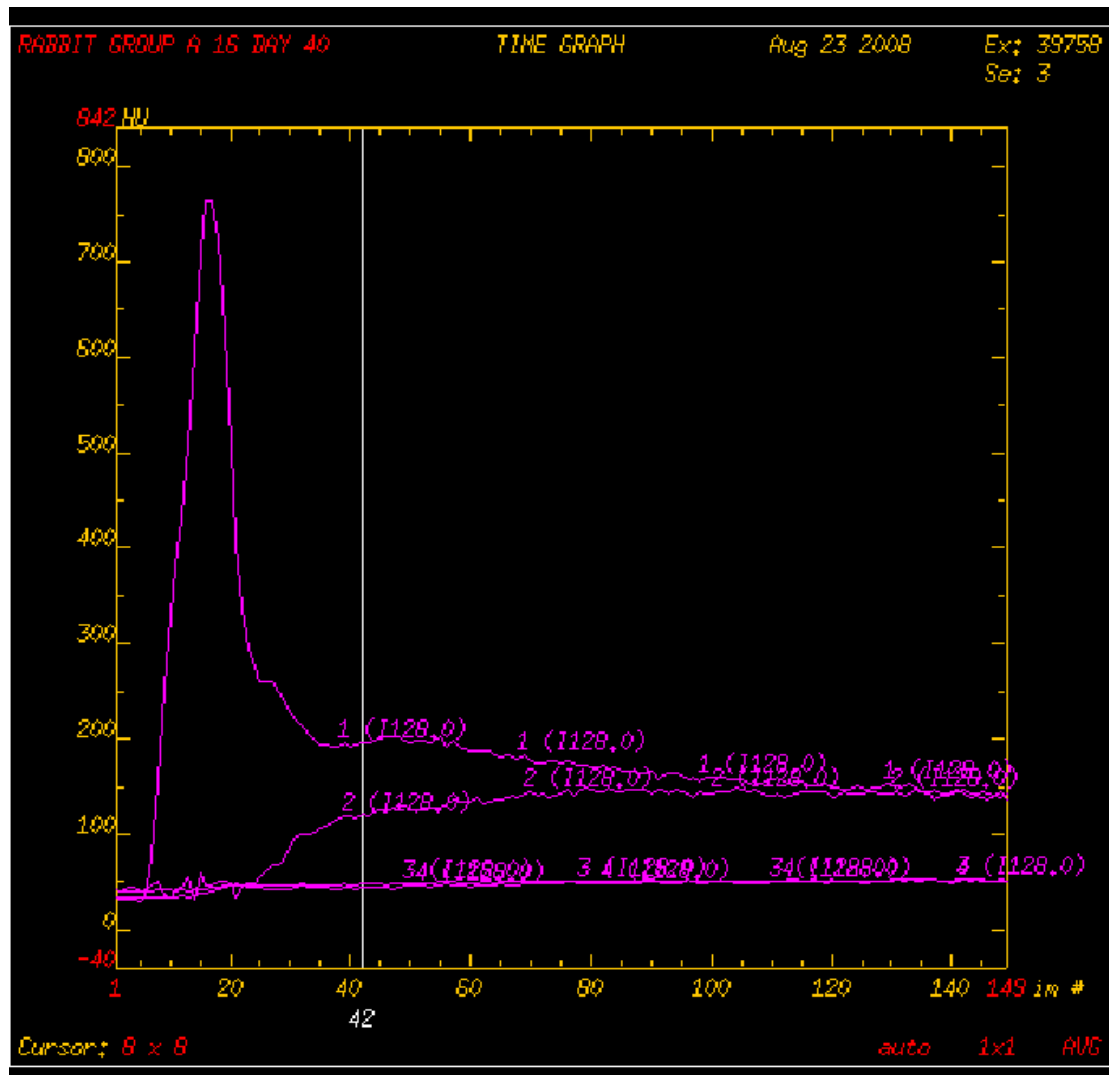
Στη συνέχεια έγινε μία απλή σάρωση του κονίκλου στον αξονικό τομογράφο από την κοιλιά και κάτω, ώστε να εντοπιστούν οι 4 τομές που απεικονίζουν ιδανικά αμφοτέρους τους μηρούς. Στο σημείο αυτό απαιτείται απόλυτη συμμετρία στην απεικόνιση των δύο άκρων, ούτως ώστε και οι μετρήσεις που θα πραγματοποιηθούν στη συνέχεια να είναι συγκρίσιμες. Σε περίπτωση που η επιθυμητή συμμετρία δεν επιτευχθεί, το πειραματόζωο επανατοποθετείται. Όταν η απεικόνιση των δύο άκρων είναι συμμετρική επιλέγονται 4 εικόνες οι οποίες αντιστοιχούν σε 4 εγκάρσια επίπεδα, που απεικονίζουν βέλτιστα τους μηρούς. Στα επίπεδα αυτά πραγματοποιείται η αξονική τομογραφία αιμάτωσης.

Εγχέονται στην ωτιαία φλέβα από το φλεβοκαθετήρα που έχει τοποθετηθεί 7ml ισότονου ισοωσμωτικού σκιαγραφικού (Visipaque 320mg, GE Healthcare) με ρυθμό έγχυσης 1ml/sec. Ταυτόχρονα με την αρχή της έγχυσης ξεκινάει επαναλαμβανόμενη σάρωση των άκρων του κονίκλου στα 4 επίπεδα, που έχουν επιλεγεί. Η σάρωση γίνεται ανά 0,5sec και διαρκεί για 60sec. Με αυτό τον τρόπο λαμβάνονται προς επεξεργασία 120 εικόνες για κάθε επίπεδο, οι οποίες απεικονίζουν την αιμάτωση του άκρου και ταυτόχρονα της κάτω κοίλης φλέβας και της αορτής στη διάρκεια των 60 sec.

Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιείται σε σταθμό εργασίας με ειδικό πρόγραμμα (CT perfusion 3, GE Healthcare). Στο συγκεκριμένο πρόγραμμα επιλέγεται ως αγγείο εισροής η κοιλιακή αορτή και ως αγγείο εκροής η κάτω κοίλη φλέβα. Επιλέγονται επίσης το χρονικό σημείο έναρξης της εισροής του σκιαγραφικού στην κοιλιακή αορτή και το χρονικό σημείο που επέρχεται ισορροπία ανάμεσα στο σκιαγραφικό που κυκλοφορεί στο αρτηριακό και το φλεβικό δίκτυο, δηλαδή το σημείο στο οποίο η καμπύλη της πυκνότητας στην κοιλιακή αορτή είναι ίση με την καμπύλη της πυκνότητας στην κάτω κοίλη φλέβα. Με τη βοήθεια των ανωτέρω στοιχείων παράγονται από το πρόγραμμα χάρτες των άκρων με τις τιμές των προς εξέταση παραμέτρων.



Εικ 26. Εγκάρσια τομή κονίκλου στο επίπεδο των μηρών. Οι δύο μικρές περιοχές ενδιαφέροντος απεικονίζουν την κοιλιακή αορτή και την κάτω κοίλη φλέβα, που χρησιμοποιούνται ως αγγεία εισροής και εκροής αντίστοιχα. Στους δύο μηρούς έχουν επιλεγεί περιοχές ενδιαφέροντος που περιλαμβάνουν τις μυϊκές ομάδες του μηρού. Στο συγκεκριμένο πειραματόζωο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της μεθόδου έχει εμβολιστεί μόνο το αριστερό κάτω άκρο και δεν έχουν δοθεί ουσίες για επαναγγείωση. Η ισχαιμία του άκρου είναι το αίτιο της υπότυκτης απεικόνισης αυτού.



Εικ 27. Απεικονίζονται οι καμπύλες πρόσληψης του σκιαγραφικού. Η οξύαιχμη καμπύλη (1) αντιστοιχεί στην αορτή και η καμπύλη 2 στην κάτω κοίλη φλέβα και δείχνουν την πυκνότητα σε κάθε αγγείο (άξονας Y) σε κάθε χρονική στιγμή μετά την έγχυση του σκιαγραφικού (άξονας X). Οι άλλες δύο καμπύλες αντιστοιχούν στις περιοχές ενδιαφέροντος σε κάθε κάτω άκρο.

Οι παράμετροι που εξετάζονται είναι:

- η αιματική ροή (BF-Blood flow),
- ο όγκος αίματος (BV-Blood volume),
- ο μέσος χρόνος μετάβασης (MTT-Mean transit time) και
- ο δείκτης διαπερατότητας επιφανείας (PS-Permeability surface).

Στην απεικονισθείσα περιοχή των μηρών, σε κάθε ένα από τα 4 επίπεδα

επιλέγεται μια περιοχή, που συμπεριλαμβάνει του μυς και αποφεύγεται να περιέχει μεγάλα αγγεία, δηλαδή αγγεία ορατά στην αξονική τομογραφία. Οι περιοχές αυτές γίνεται προσπάθεια να είναι απόλυτα συμμετρικές στα δύο κάτω άκρα. Το πρόγραμμα CT Perfusion 3 υπολογίζει σε καθεμία από αυτές τις περιοχές το μέσο όρο των προς υπολογισμό παραμέτρων. Οι τιμές από κάθε επίπεδο χρησιμοποιούνται ώστε να υπολογισθεί ο μέσος όρος για κάθε κάτω άκρο.

Ακολουθεί παρουσίαση κάθε μίας από τις παραμέτρους που υπολογίστηκαν και της σημασίας αυτής.

Ροή Αίματος (Blood Flow, BF): Ορίζεται ως ο ρυθμός ροής αίματος διά των αγγείων μίας συγκεκριμένης περιοχής ιστού. Εκφράζεται σε μονάδες $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ανά 100g ιστού ή $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Σημειώνεται ότι ο όγκος ροής αίματος που υπολογίζεται με τα σύγχρονα πρωτόκολλα αξονικής τομογραφίας αιματώσεως συμπεριλαμβάνει το ρυθμό ροής αίματος στις μεγάλες και μικρές αρτηρίες και φλέβες, καθώς και στα αρτηριόλια, τριχοειδή και μετατριχοειδικά φλεβίδια του υπό μελέτη ιστού.

Όγκος Αίματος (Blood Volume, BV): Ορίζεται ως ο πραγματικός όγκος αίματος ο οποίος «ρέει» εντός των αγγείων μίας συγκεκριμένης περιοχής ιστού. Εκφράζεται σε μονάδες ml ανά 100g ιστού ή $\text{ml}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Όπως και η Ροή Αίματος, ο Όγκος Αίματος περιλαμβάνει το συνολικό όγκο αίματος που ρέει εντός των μεγάλων και μικρών αρτηριών και φλεβών, καθώς και στα αρτηριόλια, τριχοειδή και μετατριχοειδικά φλεβίδια του ιστού σε μία δεδομένη χρονική στιγμή. Οποιαδήποτε στάσιμη ποσότητα αίματος δεν θα συμπεριληφθεί στον υπολογισμό του συνολικού Όγκου Αίματος.

Μέσος Χρόνος Διέλευσης (Mean transit Time, MTT): Ορίζεται ως ο μέσος χρόνος, που χρειάζονται τα συστατικά του αίματος για να διασχίσουν το δίκτυο του κυκλοφορικού του ιστού από το εγγύτατο αρτηριακό έως το απώτατο φλεβικό άκρο. Εάν η αρτηριακή πίεση αιματώσεως (pressure head) είναι μεγάλη, τότε το αίμα ταξιδεύει με μεγαλύτερη ταχύτητα διά του αγγειακού δικτύου του ιστού και ο μέσος χρόνος διέλευσης είναι μικρότερος από όταν η πίεση αιματώσεως είναι μικρότερη. Υπό αυτήν την έννοια, ο Μέσος Χρόνος Διέλευσης αποτελεί μία μεταβλητή υποκατάστασης για την πίεση αιματικής άρδευσης των ιστών . Ο Μέσος χρόνος διέλευσης εκφράζεται συνήθως σε δευτερόλεπτα (sec).

Γινόμενο Διαπερατότητας- Εμβαδού Τριχοειδικής Επιφάνειας (παράγων διαπερατότητας τριχοειδικής επιφάνειας) (Capillary Permeability Surface Area Product, PS): Το γινόμενο της διαπερατότητας των τριχοειδών αγγείων και της συγκέντρωσης ενός διαλύτη στο αίμα επιτρέπει τον υπολογισμό της μονόδρομης διηθητικής ροής του διαλύτη από το αίμα (ενδοαγγειακό διαμέρισμα) προς τον εξωαγγειακό χώρο (εξωαγγειακό διαμέρισμα) ανά μονάδα επιφάνειας τριχοειδικού ενδοθηλίου. Το Γινόμενο Διαπερατότητας Εμβαδού Τριχοειδικής Επιφάνειας είναι το γινόμενο της αγγειακής διαπερατότητας και του συνολικού εμβαδού τριχοειδικής επιφάνειας ανά μονάδα μάζας ιστού (συνήθως ανά 100g ιστού) και ουσιαστικά αντιστοιχεί στην ολική ροή διήθησης κατά μήκος όλων των τριχοειδών της δεδομένης μάζας ιστού. Συνήθως εκφράζεται σε μονάδες ml.min⁻¹ ανά 100g ιστού ή ml.min⁻¹.100g⁻¹. Έτσι το PS μπορεί να αξιολογηθεί ως ο ρυθμός μονόδρομης ροής ενός διαλύτη (ιωδιούχου σκιαγραφικής ουσίας εν προκειμένω) από τον ενδοαγγειακό όγκο αίματος στον

εξωκυττάριο διάμεσο χώρο και φυσικά εξαρτάται τόσο από το ρυθμό Ροής Αίματος όσο και από την συνολική επιφάνεια του ενδοθηλίου των τριχοειδών. Κατά συνέπεια, ιστοί με αυξημένο ρυθμό αγγειογένεσης, όπως για παράδειγμα ο καρκινικός ιστός ή ο μυϊκός ιστός υπό συνθήκες ισχαιμίας, θα έχουν μεγαλύτερη ενδοθηλιακή τριχοειδική επιφάνεια λόγω δυναμικής γένεσης νέων μικροαγγειακών δικτύων και άρα θα χαρακτηρίζονται από αυξημένο δείκτη PS.

ii. Ψηφιακή ενδοαρτηριακή αγγειογραφία

Η ψηφιακή αγγειογραφία γίνεται με την τεχνική της διαωτιαίας πρόσβασης, όπως περιγράφηκε στον εμβολισμό. Ένας καθετήρας 4F εισάγεται στην κοιλιακή αορτή με το άκρο του 2-3εκ προ του διχασμού της. Οι εικόνες της ψηφιακής αγγειογραφίας ελήφθησαν σε αγγειογράφο Philips DVI-S, χρησιμοποιώντας πρωτόκολλο λήψης μίας εικόνας ανά δευτερόλεπτο στα 40-90KV. Μη ιονικό ιωδιούχο σκιαγραφικό εγχύθηκε στον καθετήρα με ρυθμό έγχυσης 1ml/sec και συνολικό όγκο 3ml, με τη βοήθεια αυτόματου εγχυτή. Τα άκρα των κονίκλων τοποθετήθηκαν σε απόσταση 25εκ από τη λυχνία. Η απόσταση του εστιακού σημείου εκπομπής από τον ενισχυτή εικόνας ήταν 110εκ. Ένα φίλτρο αλουμινίου παρεμβαλλόταν μεταξύ του αντικειμένου-πειραματόζωου και του ενισχυτή εικόνας του αγγειογράφου, προκειμένου να επιτευχθεί ομογενοποίηση του πεδίου και να αυξηθεί η ποιότητα της εικόνας.



Εικ 28. Παράδειγμα αγγειογραφίας την μέρα 40 από τον εμβολισμό. Η απόφραξη ξεκινάει αμφοτερόπλευρα από το ύψος της έκφυσης των έξω λαγονίων. Εκτεταμένο παράπλευρο αρτηριακό δίκτυο έχει δημιουργηθεί άμφοτερόπλευρα από κλάδους της έσω λαγονίου αρτηρίας.

iii. Ποσοτικοποίηση της ενδοαρτηριακής αγγειογραφίας

Για την μετα-επεξεργασία των ψηφιακών αγγειογραφικών εικόνων DSA χρησιμοποιήθηκε μία βελτιωμένη μέθοδος για ποσοτική ανάλυση της αγγείωσης σε εικόνες αγγειογραφίας που βασίζεται στη θεωρία του πολυεπίπεδου δομικού τελεστή (multiscale structural tensor) [274]. Συγκεκριμένα, η αρχική εικόνα ομαλοποιείται με τη

χρήση ενός δισδιάστατου Gaussian πυρήνα τυπικής απόκλισης. Στη συνέχεια, ο πίνακας Hessian (δομικός πίνακας) παράγεται από τη δεύτερη παραγωγή του Gaussian πυρήνα της εικόνας. Με μια βηματική ανάλυση των ιδιοτιμών του πίνακα Hessian καταλήγουμε σε ακριβή τμηματοποίηση των αγγειακών δομών μέσα στην εικόνα [274]. Η εφαρμογή του λογισμικού υπάρχει διαθέσιμη στον παγκόσμιο ιστό για δωρεάν λήψη στην ακόλουθη ιστοσελίδα: <http://stat.med.upatras.gr/JDI> [274]. Μια ορθογώνια περιοχή ενδιαφέροντος (Region of interest; ROI) σχεδιάστηκε στην επιφάνεια του μηρού ώστε να περιλαμβάνει τα νεοσχηματισμένα παράπλευρα δίκτυα αρτηριών. Οι ίδιες περιοχές ενδιαφέροντος χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα άκρα, ώστε να αναπαραχθούν ίσες περιοχές δειγματοληψίας. Οι μετρήσεις των εικονοστοιχείων (pixels) κανονικοποιήθηκαν περαιτέρω με βάση ένα γνωστό πρότυπο μέγεθος (άκρο του αγγειογραφικού καθετήρα 4Fr όπου 1Fr = 333μm που ήταν τοποθετημένος στην κατώτερη κοιλιακή αορτή πάνω από το επίπεδο του διχασμού των λαγονίων). Η διάμετρος των αγγείων προσδιορίστηκε με την χρήση ακτινοσκοπικού χάρακα, που είχε τοποθετηθεί δίπλα στην ουρά ανάμεσα στα πόδια των κονίκλων. Αρχικά καταμετράται το συνολικό εμβαδόν των ψηφιακά απομονωμένων παράπλευρων αγγείων και στη συνέχεια καταμετράται το συνολικό τους μήκος, εφαρμόζοντας μια διαδικασία σκελετοποίησης (skeletonization processing) που συμπυκνώνει κάθε αγγειακή δομή σε 75 διάμετρο ενός εικονοστοιχείου. Τα αγγεία ομαδοποιήθηκαν σε δύο κατηγορίες: σε αυτά που έχουν διάμετρο <500 μm (μικροαγγείωση) και σε αυτά που έχουν διάμετρο >500μm (μεγάλα παράπλευρα αγγεία). Με επίκεντρο τη διαδικασία της αρτηριογένεσης και ανάπτυξης μεγάλων παράπλευρων

αρτηριών, το λογισμικό μετα-επεξεργασίας εικόνας απομόνωσε και ποσοτικοποίησε δίκτυα αγγείων με διάμετρο μεγαλύτερη από 500μm. Η επιβεβαίωση της αξιοπιστίας της προαναφερθείσας τεχνικής ανάδειξης και ποσοτικοποίησης της μικροαγγείωσης έχει ήδη πραγματοποιηθεί με την ευρέως αποδεκτή τεχνική του αγγειακού corrosion casting που έχει περιγραφεί από τον Castenholz [275]. Η λεπτομερής σύγκριση του Cast με την αγγειογραφική εικόνα στο μοντέλο της χοριοαλλαντοϊδικής μεμβράνης ανέδειξε πλήρη αναγνώριση και ταύτιση των αγγείων που είναι μεγαλύτερα από 100μm, ενώ για τα αγγεία μεταξύ 50μm και 100μm υπήρξε ταύτιση κατά προσέγγιση. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην δυσκολία πλήρους αγγειογραφικής ανάδειξης της πορείας των αγγείων λόγω των πολλαπλών ελικώσεων και ανακάμψεων των εν λόγω αγγείων και την συνεπαγόμενη επιτροβολή τους.



Εικ 29. Ποσοτικοποίηση της αγγειογραφίας με τον ειδικό αλγόριθμο, όπου απομονώνονται τα αγγεία με διάμετρο $>500\mu\text{m}$.

iv. Ιστολογική εξέταση

Η επεξεργασία και μελέτη των δειγμάτων στ οποία έγινε ιστολογική εξέταση, πραγματοποιήθηκε από το τμήμα Ανατομίας, Ιστολογία και Εμβρυολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών και συγκεκριμένα από την καθηγήτρια Πέτρου-Παπαδακη

Ελένη και τον κύριο Λίλη Ιωάννη. Τα κάτω άκρα των κονίκλων οι οποίοι θανατώθηκαν παρασκευάστηκαν και δείγματα των προσαγωγών μυών συλλέχτηκαν και σταθεροποιήθηκαν σε φορμόλη. Τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε παραφίνη και ετμήθησαν σε τεμάχια πάχους 5χιλ. Έγινε ανοσοϊστοχημεία με μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον του CD31 (διάλυμα 1:600, DAKO, Glostrup, Denmark), ο οποίος είναι ένας μελετημένος ενδοθηλιακός δείκτης, προκειμένου να αναγνωριστούν τα αιμοφόρα αγγεία, όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν [166]. Η εμφάνιση των τριχοειδών αγγείων και των αρτηριολίων σε όλες τις τομές μετρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x20 και x40) και καταγράφηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Η ιστολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα από 2 παθολογοανατόμους, οι οποίοι δεν γνώριζαν ο ένας τα αποτελέσματα του άλλου.

4. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Graphpad Prism 5.0 (Graphpad). Για να εκτιμηθούν οι διαφορές ανάμεσα στα άκρα στα οποία χορηγήθηκαν οι ουσίες και στα αντίθετα άκρα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκε το paired t-test. Επιπλέον υπολογίστηκε ο λόγος των παραμέτρων του CT perfusion και της αγγειογραφίας του άκρου που χορηγήθηκαν οι ουσίες προς το αντίθετο άκρο. Πραγματοποιήθηκε one sample t-test προκειμένου να αναγνωριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές του λόγου με την τιμή 1, η οποία αντιπροσωπεύει την απουσία φαρμακολογικού αποτελέσματος. Οι συγκρίσεις ανάμεσα στις διάφορες ομάδες έγιναν χρησιμοποιώντας το student t-test ή one way analysis of variance, προκειμένου να εντοπιστούν στατιστικά σημαντικές

διαφορές ανάμεσα στις 6 διαφορετικές ομάδες. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές \pm σταθερή απόκλιση (Standard deviation). Οι τιμές p value < 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

B. Αποτελέσματα

1. Αποτελέσματα αξονικής τομογραφίας αιμάτωσης (CT Perfusion)- Αγγειογένεση

Η δυναμική αξονική τομογραφία που πραγματοποιήθηκε παρέχει μία άμεση in vivo λειτουργική μέτρηση της αιματικής ροής στο κάτω άκρο, περιφερικά της εμβολισμένης μηριαίας αρτηρίας. Ο στόχος της θεραπευτικής αγγειογένεσης είναι να επιτύχει βελτίωση της αιματικής ροής στον ισχαιμικό ιστό. Παρουσιάζονται στη συνέχεια τα αποτελέσματα που δείχνουν την δράση κάθε ουσίας.

i. NGF

Αρχικά έγιναν προκαταρκτικές μελέτες , σε μια προσπάθεια να προσδιοριστεί η αποτελεσματική δόση του NGF σε ισχαιμικά άκρα κονίκλων. Χορηγήθηκαν αρχικά 3 δόσεις των 50mg ανά πειραματόζωο σε 3 πειραματόζωα. Σε αυτή τη δοσολογία δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες διαφορές ανάμεσα στο άκρο που χορηγήθηκε ο NGF και το άκρο μάρτυρα. Ως εκ τούτου η δοσολογία αυξήθηκε σταδιακά και ενδείξεις αγγειογένεσης παρατηρήθηκαν σε δοσολογία 100mg ανά δόση (3 δόσεις συνολικά). Περαιτέρω αύξηση της δοσολογίας δεν κρίθηκε σκόπιμη, προκειμένου η δόση να παραμείνει σε επίπεδα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο εξής είναι τα προκύπτοντα με αυτή τη δοσολογία.

Η μέση απόλυτη τιμή της αιματικής ροής (BF) και του όγκου αίματος (BV) ήταν μεγαλύτερη κατά 30% και 22% αντίστοιχα στα άκρα που έλαβαν NGF, συγκριτικά με τα ετερόπλευρα άκρα μάρτυρες ($15,43 \pm 7,87$ και $0,72 \pm 0,2$ συγκριτικά με $11,84 \pm 4,74$ και $0,59 \pm 0,14$ αντίστοιχα). Το paired t-test έδειξε επαρκή συσχέτιση και στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών της αιματικής ροής και του όγκου αίματος (correlation coefficients 0,872 και 0,625 και $p=0,022$ και $p=0,020$ αντίστοιχα). Επιπλέον ο μέσος λόγος της αιματικής ροής και του όγκου αίματος των άκρων που έλαβαν NGF, προς τις αντίστοιχες τιμές στα άκρα που δεν έλαβαν NGF ήταν $1,3 \pm 0,36$ και $1,24 \pm 0,27$ αντίστοιχα. Το one-sample t-test έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των ανωτέρω λόγων συγκριτικά με την μονάδα ($p=0,020$ και $p=0,016$).

ii. Θρομβίνη

Η θρομβίνη χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας, καθώς έχει περιγραφεί στο παρελθόν η ικανότητά της να επάγει την αρτηριογένεση και την αιμοδυναμική βελτίωση σε παρόμοιο μοντέλο οπισθίων άκρων κονίκλων [166]. Πραγματικά και στο παρόν πείραμα η θεραπεία με θρομβίνη (5000 μονάδες ανά πειραματόζωο για 3 φορές), είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των αιμοδυναμικών παραμέτρων του CT perfusion (BF: $14,33 \pm 3,50$ στο άκρο που χορηγήθηκε η θρομβίνη, έναντι $10,7 \pm 3,67$ στο άκρο μάρτυρα και BV: $0,60 \pm 0,06$ στο άκρο που χορηγήθηκε η θρομβίνη, έναντι $0,51 \pm 0,09$ στο άκρο μάρτυρα). Επιπλέον ο μέσος λόγος της αιματικής ροής και του όγκου αίματος των άκρων που έλαβαν θρομβίνη, προς τις αντίστοιχες τιμές στα άκρα που δεν έλαβαν θρομβίνη ήταν $1,55 \pm 0,44$ και $1,20 \pm 0,12$ αντίστοιχα. Το one-sample t-test έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των ανωτέρω λόγων συγκριτικά με την μονάδα ($p=0,0482$ και $p=0,017$).

iii. Αναστολείς των υποδοχέων

Η φαρμακολογική οδός μέσω της οποίας ο NGF βελτιώνει την αιμοδυναμική ανάρρωση ερευνήθηκε χρησιμοποιώντας τους K252a και SU5416, οι οποίοι είναι αναστολείς των διαμεμβρανικών υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης εν προκειμένω του NGF και του VEGF αντίστοιχα. Αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση αυτών των αναστολέων (K252a: 240μg ανά πειραματόζωο τρεις φορές, SU5416: 530μg ανά πειραματόζωο τρεις φορές) στην ενδογενή αιμοδυναμική ανάρρωση. Αμφότεροι οι αναστολείς εμπόδιζαν την ενδογενή δημιουργία παράπλευρων δικτύων μετά την ισχαιμία υποδηλώνοντας ότι οι trkA- και VEGFR2- οδοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην αυθόρμητη ενδογενή δημιουργία παράπλευρων δικτύων στα οπίσθια άκρα των ζώων.

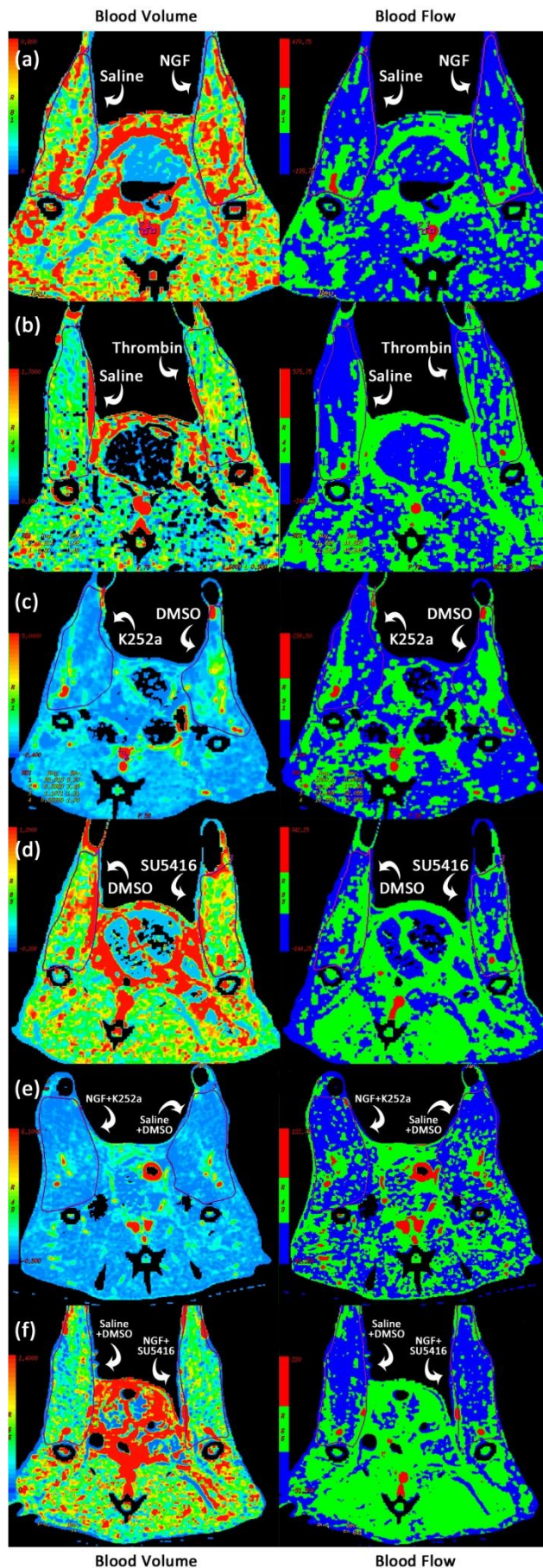
Η μέση απόλυτη τιμή της αιματικής ροής (BF) και του όγκου αίματος (BV) ήταν μικρότερη κατά 38% και 44% αντίστοιχα στα άκρα που έλαβαν K252a, συγκριτικά με τα ετερόπλευρα άκρα μάρτυρες ($11,26 \pm 3,08$ και $0,58 \pm 0,04$ συγκριτικά με $15,5 \pm 4,35$ και $0,84 \pm 0,06$ αντίστοιχα). Το paired t-test έδειξε επαρκή συσχέτιση και στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών της αιματικής ροής και του όγκου αίματος (correlation coefficients 0,957 και 0,455 και $p=0,047$ και $p=0,038$ αντίστοιχα). Επιπλέον ο μέσος λόγος της αιματικής ροής και του όγκου αίματος των άκρων που έλαβαν K252a, προς τις αντίστοιχες τιμές στα άκρα μάρτυρες ήταν $0.73 \pm 0,06$ και $0.70 \pm 0,09$ αντίστοιχα. Το one-sample t-test έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των ανωτέρω λόγων συγκριτικά με την μονάδα ($p=0,018$ και $p=0,029$).

Η μέση απόλυτη τιμή της αιματικής ροής (BF) και του όγκου αίματος (BV) ήταν μικρότερη κατά 39% και 30% αντίστοιχα στα άκρα που έλαβαν SU5416, συγκριτικά με τα ετερόπλευρα άκρα μάρτυρες

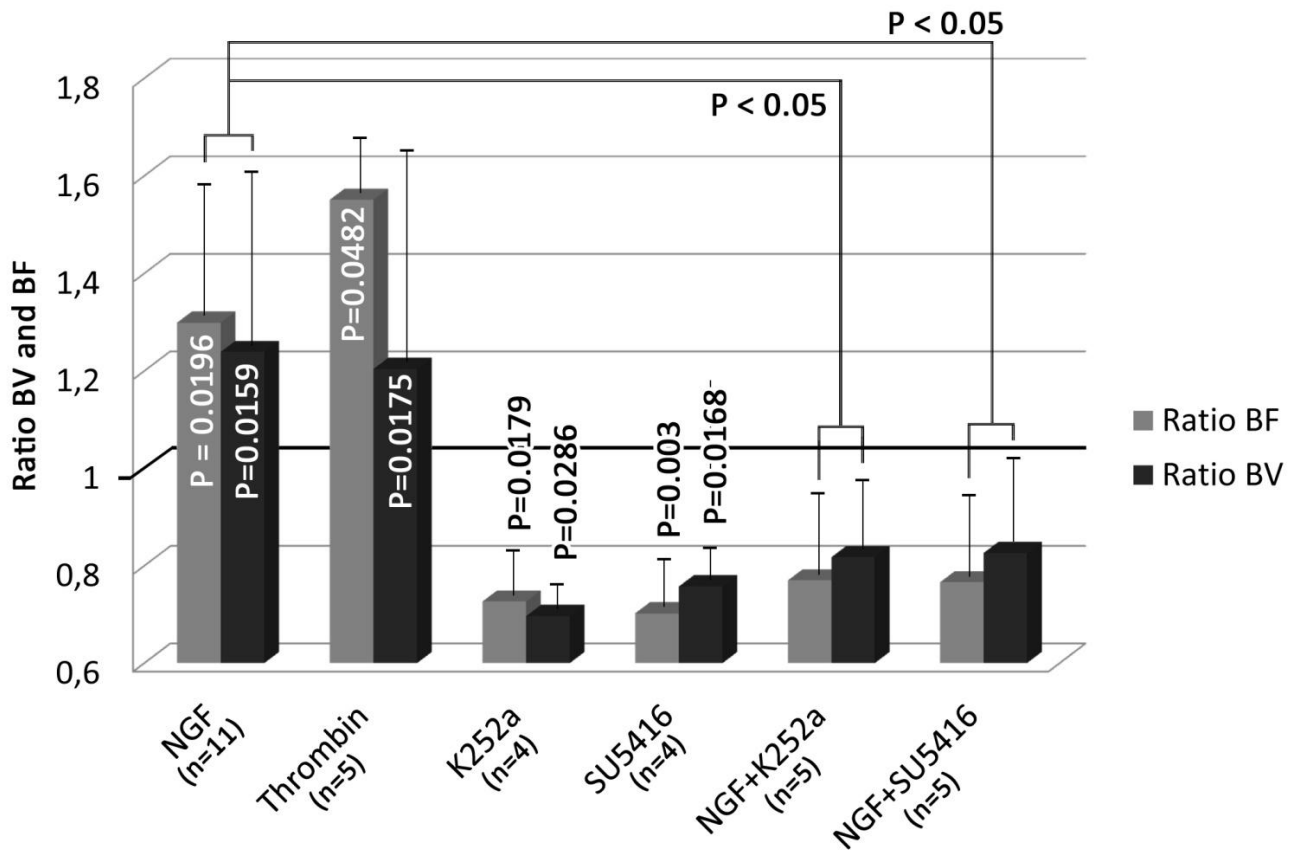
(10.14 ± 6.26 και $0,50 \pm 0,16$ συγκριτικά με 14.14 ± 8.09 και $0,65 \pm 0,15$ αντίστοιχα). Το paired t-test έδειξε επαρκές ταίριασμα και στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών της αιματικής ροής και του όγκου αίματος (correlation coefficients 0,99 και 0,94 και $p=0,028$ και $p=0,012$ αντίστοιχα). Επιπλέον ο μέσος λόγος της αιματικής ροής και του όγκου αίματος των άκρων που έλαβαν SU5416, προς τις αντίστοιχες τιμές στα άκρα μάρτυρες ήταν $0.70 \pm 0,07$ και $0.76 \pm 0,10$ αντίστοιχα. Το one-sample t-test έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά των ανωτέρω λόγων συγκριτικά με την μονάδα ($p=0,003$ και $p=0,017$).

iv. Συνδυασμός αναστολέων των υποδοχέων και NGF

Στα πειραματόζωα στα οποία κάθε ένας από τους αναστολείς συνδυάστηκε με τον NGF παρατηρήθηκε μειωμένη αιματική ροή και όγκος αίματος συγκριτικά με τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε μόνο ο NGF. Ο μέσος λόγος της αιματικής ροής και του όγκου αίματος των άκρων στα οποία χορηγήθηκε συνδυασμός K252a και NGF προς τα άκρα στα οποία χορηγήθηκε μόνο ο διαλύτης αμφοτέρων των ουσιών ήταν $0,77 \pm 0,15$ και $0,78 \pm 0,2$ αντίστοιχα. Οι ίδιοι λόγοι για την αιματική ροή και τον όγκο αίματος του συνδυασμού SU5416 και NGF ήταν $0,77 \pm 0,18$ και $0,83 \pm 0,17$ αντίστοιχα. Η one way analysis of variance με συγκριτικό τεστ newmans-keuls , έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στους λόγους της αιματικής ροής και του όγκου αίματος αμφοτέρων των συνδυασμών, συγκριτικά με τους λόγους του NGF.



Εικόνα 30: Αντιπροσωπευτικές εικόνες των χρωματικών χαρτών της αιματικής ροής και του όγκου αίματος μετά από επεξεργασία των δεδομένων με το ειδικό πρόγραμμα αιμάτωσης του αξονικού τομογράφου. Απεικονίζονται αμφότερα τα άκρα και οι περιοχές ενδιαφέροντος οι οποίες έχουν επιλεγεί σε καθένα από αυτά για κάθε πειραματόζωο. Η χρωματική κλίμακα της αιματικής ροής και του όγκου αίματος φαίνεται στο αριστερό άκρο των εικόνων και ποικίλλει ανάμεσα στις εικόνες έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η ιδανική απεικόνιση των διαφορών ανάμεσα στα δύο άκρα. Στις εικόνες φαίνονται οι χρωματικοί χάρτες της αιματικής ροής και του όγκου αίματος μετά από χορήγηση NGF (a), θρομβίνης (b), K250A (c), SU5416 (d) ή των συνδυασμών NGF + K250A (e) και NGF + SU5416 (f).



Εικόνα 31: Παρουσιάζονται τα αθροιστικά δεδομένα της αξονικής τομογραφίας αιμάτωσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος του όγκου αίματος (γκρι μπάρες) ή της αιματικής ροής (μαύρες μπάρες) των άκρων στα οποία χορηγήθηκαν οι ουσίες προς τον όγκο αίματος ή της αιματικής ροής των άκρων μαρτύρων.

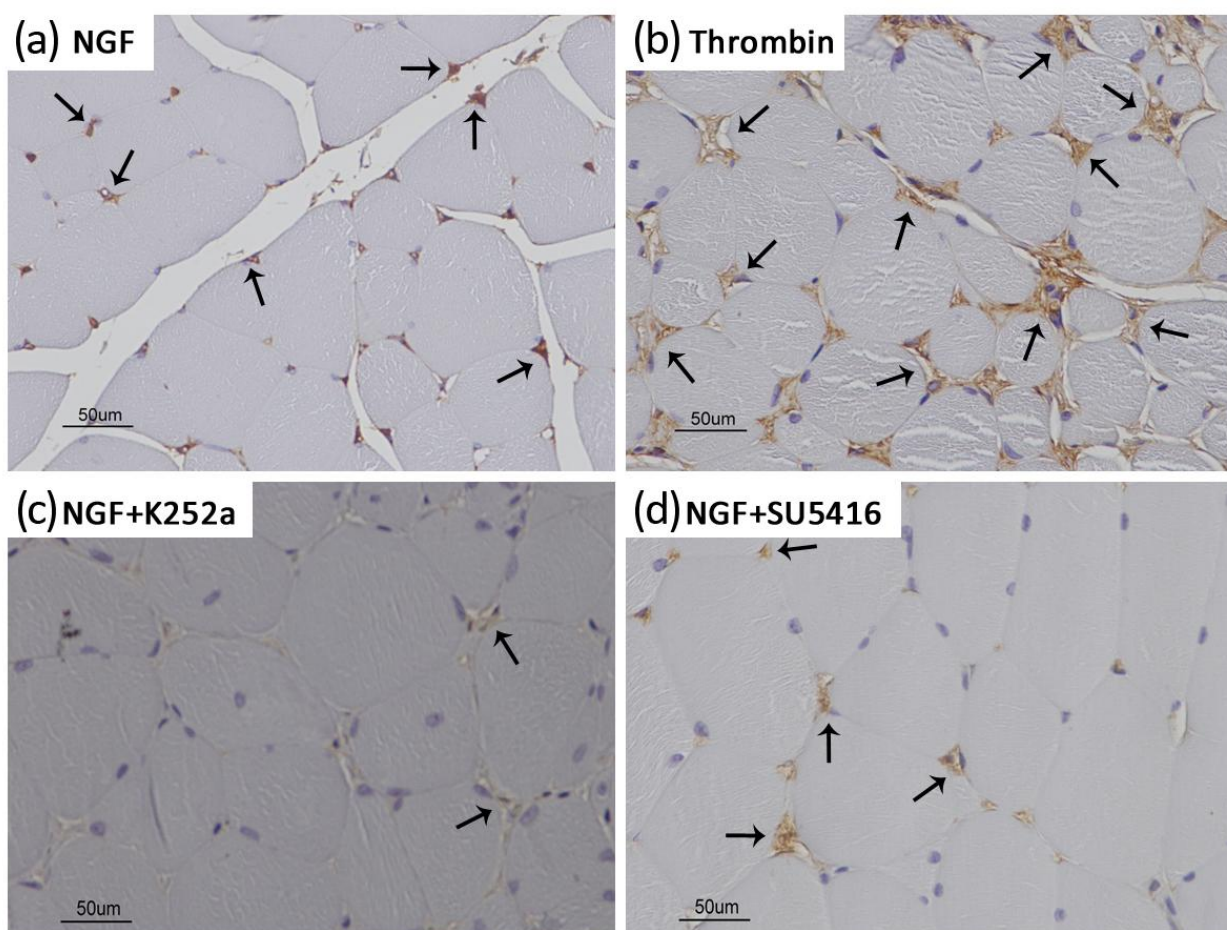
Αναγράφονται οι *p* values όπου υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τη μονάδα με βάση το *one sample t-test*.

Αναδεικνύεται επίσης η στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών στις ομάδες NGF+K252a και NGF+SU5416 από την ομάδα του NGF με τη χρήση του *paired t-test*.

v. Ιστολογική ανάλυση

Η ιστολογική ανάλυση με ανοσοϊστοχημεία CD31 σε αντιπροσωπευτικά δείγματα με μεγέθυνση X 40 ήταν συμβατή με τις απεικονιστικές παρατηρήσεις και έδειξε αύξηση των τριχοειδικών αγγείων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε NGF ή θρομβίνη. Η αύξηση

αυτή ήταν μεγαλύτερη στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε η θρομβίνη. Αντίθετα, στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε ο συνδυασμός των αναστολέων με τον NGF, ο αριθμός των τριχοειδών ήταν μειωμένος συγκριτικά με τα άκρα τα οποία έλαβαν μόνο NGF.



Εικόνα 32: Ιστολογικές τομές μετά από χρώση CD31 αντιπροσωπευτικών προσαγωγών μυών από ισχαιμικά άκρα 40 μέρες μετά τον εμβολισμό. Απεικονίζονται οι εικόνες των άκρων που έχουν λάβει θεραπεία από κάθε ομάδα (μεγέθυνση X40) και τα μαύρα βέλη δείχνουν τα τριχοειδή. Σχετικά μεγάλος αριθμός τριχοειδών απεικονίζεται στην ομάδα του NGF (a). Ακόμη μεγαλύτερος αριθμός τριχοειδών παρατηρείται στο δείγμα από την ομάδα της θρομβίνης (b). Μειωμένος αριθμός τριχοειδών παρατηρείται στα δείγματα από τις ομάδες συνδυασμού του NGF με κάποιον από τους αναστολείς (c,d).

vi. Μέσος χρόνος διέλευσης (MTT) και παράγοντας τριχοειδικής διαπερατότητας (PS)

Ο μέσος χρόνος διέλευσης (MTT) και ο παράγοντας τριχοειδικής διαπερατότητας (PS) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα άκρα που έλαβαν ουσίες και σε αυτά που δεν έλαβαν. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες.

vii. Συμπέρασμα

Οι μελέτες με την αξονική τομογραφία αιμάτωσης, οι οποίες επιβεβαιώθηκαν και από τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης, έδειξαν σημαντική βελτίωση της αιμοδυναμικής ανάρρωσης στα άκρα που χορηγήθηκε NGF ή θρομβίνη, επιβεβαιώνοντας έτσι την αγγειογενετική δράση αυτών των ουσιών. Αντίθετα, η χορήγηση των αναστολέων αναίρεσε την αγγειογενετική δράση του NGF, υποδηλώνοντας έτσι ότι η αγγειογενετική δράση του NGF πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων trkA- και VEGFR2

2. Αποτελέσματα αγγειογραφίας-αρτηριογένεση

Τα νεοσχηματισμένα παράπλευρα αγγεία ποσοτικοποιήθηκαν με ψηφιακή ενδοαρτηριακή αγγειογραφία, η οποία θεωρείται η πιο κατάλληλη μέθοδος για την in vivo απεικόνιση των αγγειακών δικτύων. Συγκεκριμένα, επειδή η μελέτη εστιάστηκε στο αρτηριογενετικό αποτέλεσμα, ποσοτικοποιήθηκαν μεγάλες παράπλευρες αρτηρίες (διάμετρος > 500 μm). Όπως είναι αναμενόμενο σε όλα τα πειραματόζωα με ισχαιμία οπισθίων άκρων παρατηρείται φυσιολογικά σημαντική αύξηση της μυϊκής αγγειοβρίθειας, με το σχηματισμό

παράπλευρων αρτηριών [166]. Αυτή η ενδογενής αρτηριογενετική αντίδραση δε φάνηκε να αυξάνεται στα πειραματόζωα που έλαβαν θεραπεία με NGF. Συγκεκριμένα, ο λόγος της συνολικής επιφάνειας των αγγείων στα άκρα τα οποία έλαβαν θεραπεία με NGF προς την επιφάνεια των αγγείων στα άκρα μάρτυρες ήταν $1,06 \pm 0,1$. Αντίθετα, η χορήγηση της θρομβίνης (5000 IU ανά πειραματόζωο 3 φορές) είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της επιφάνειας των αγγείων με το μέσο όρο του λόγου των άκρων που έλαβαν θεραπεία προς τα άκρα μάρτυρες να φτάνει το $1,125 \pm 0,066$ (one sample t test $p=0.0131$).

Ακολουθεί η αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αγγειογραφίας μετά τη χορήγηση κάθε ουσίας.

i. NGF

Ο μέσος λόγος της συνολικής επιφάνειας των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε NGF, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,06 \pm 0,10$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,202$). Επίσης, ο μέσος λόγος του συνολικού μήκους των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε NGF, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,06 \pm 0,11$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,242$).

ii. Θρομβίνη

Η μέση απόλυτη τιμή της συνολικής επιφάνειας των αγγείων και του συνολικού μήκους των αγγείων ήταν μεγαλύτερη κατά 11% στα άκρα που έλαβαν θρομβίνη, συγκριτικά με τα ετερόπλευρα άκρα μάρτυρες (57208 ± 8888 και 18485 ± 2436 συγκριτικά με 50732 ± 6574 και 16429 ± 2118 αντίστοιχα). Ο μέσος λόγος της συνολικής επιφάνειας

των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε θρομβίνη, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,12 \pm 0,06$. Ο λόγος εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,0131$). Επίσης, ο μέσος λόγος του συνολικού μήκους των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε θρομβίνη, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,13 \pm 0,11$. Ο λόγος οριακά δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,0584$).

iii. Αναστολείς υποδοχέων

Ο μέσος λόγος της συνολικής επιφάνειας των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε K2542a, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,09 \pm 0,14$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,3784$). Επίσης, ο μέσος λόγος του συνολικού μήκους των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε K252a, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,10 \pm 0,22$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,513$).

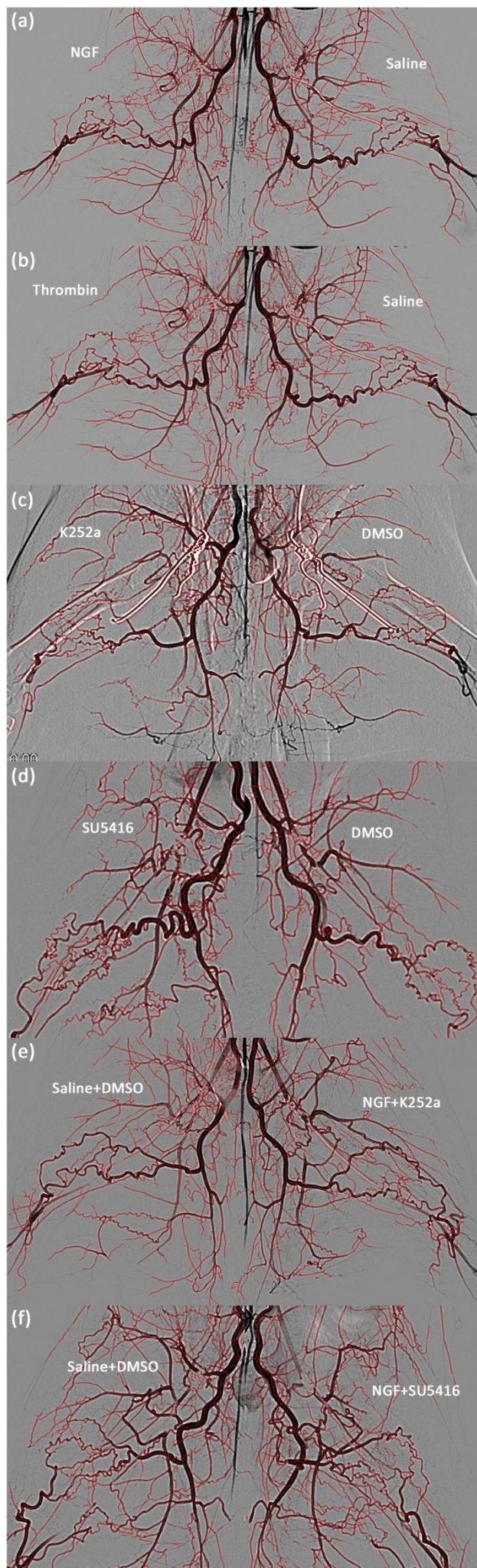
Ο μέσος λόγος της συνολικής επιφάνειας των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε SU5416, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $0,99 \pm 0,10$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,926$). Επίσης, ο μέσος λόγος του συνολικού μήκους των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε SU5416, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,00 \pm 0,10$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,965$).

iv. Συνδυασμός NGF με αναστολείς υποδοχέων

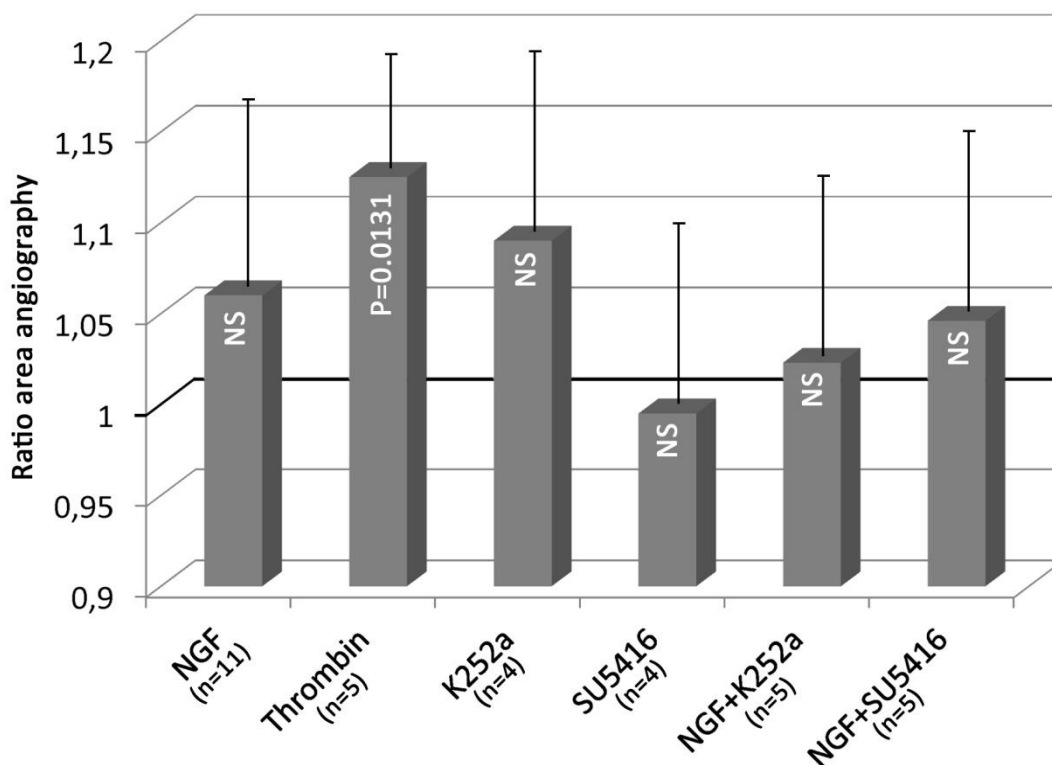
Ο μέσος λόγος της συνολικής επιφάνειας των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε NGF και K252a, προς τα άκρα μάρτυρες

ήταν $1,02 \pm 0,17$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,809$). Επίσης, ο μέσος λόγος του συνολικού μήκους των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε NGF και K252a, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,01 \pm 0,17$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,956$).

Ο μέσος λόγος της συνολικής επιφάνειας των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε NGF και SU5416, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,05 \pm 0,16$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,548$). Επίσης, ο μέσος λόγος του συνολικού μήκους των αρτηριολίων στα άκρα στα οποία χορηγήθηκε NGF και SU5416, προς τα άκρα μάρτυρες ήταν $1,03 \pm 0,18$. Ο λόγος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη μονάδα ($P=0,740$).



Εικόνα 33: Αντιπροσωπευτικές εικόνες των ποσοτικοποιημένων αγγειογραφιών την 40^η ημέρα μετά τον εμβολισμό. Απεικονίζονται οι αγγειογραφίες των άκρων στα οποία είχε χορηγηθεί NGF (a), θρομβίνη (b), K252a (c), SU5416 (d) ή οι συνδυασμοί του NGF με τους αναστολείς (e,f), καθώς και των άκρων μάρτυρα σε κάθε περίπτωση, όπως αυτό παρουσιάζεται στα αντίστοιχα υπομνήματα. Φαίνεται ότι ακόμα και στη θρομβίνη, όπου φάνηκε με την ποσοτικοποίηση στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιφάνεια των αγγείων ανάμεσα στα δύο άκρα, η διαφορά αυτή είναι δύσκολο να εκτιμηθεί παρατηρώντας την αγγειογραφία, χωρίς την επεξεργασία αυτής. Παρατηρείται ωστόσο, στο άκρο που έλαβε θρομβίνη σχετικά πυκνότερο παράπλευρο αρτηριακό δίκτυο και αυξημένο πάχος των παράπλευρων αγγείων, συγκριτικά με το άκρο μάρτυρα.

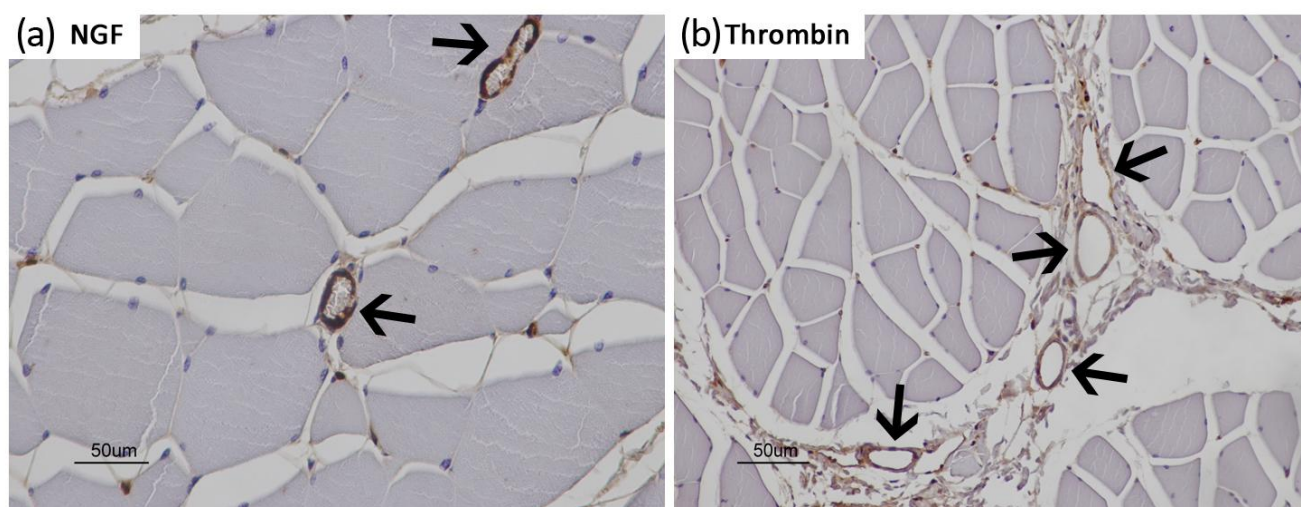


Εικόνα 34: Παρουσιάζονται τα αθροιστικά δεδομένα της ποσοτικοποιημένης αφαιρετικής αγγειογραφίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος της συνολικής επιφάνειας των αγγείων των άκρων στα οποία χορηγήθηκαν οι ουσίες προς τη συνολική επιφάνεια των αγγείων στα άκρα μάρτυρες. Αναγράφεται η *p* value στην ομάδα της θρομβίνης, όπου αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά του λόγου από τη μονάδα με το *one sample t-test*.

v. Ιστολογική ανάλυση

Η ανοστοϊστοχημική εξέταση με CD31 επιβεβαίωσε τα αγγειογραφικά αποτελέσματα, καθώς αντιπροσωπευτικά δείγματα με μεγέθυνση X20 έδειξαν ότι ο αριθμός των αρτηριολίων με μέγεθος περίπου 50 μm αυξήθηκε στα άκρα που θεραπεύτηκαν με θρομβίνη και όχι στα άκρα τα οποία έλαβαν NGF. Στις ομάδες τις οποίες χορηγήθηκαν οι αναστολείς K252A SU5416 είτε μόνοι τους είτε σε συνδυασμό με NGF οι αγγειογραφικές εικόνες δεν έδειξαν καμία

σημαντική διαφορά ανάμεσα στα άκρα που έλαβαν τις ουσίες και τα άκρα μάρτυρες.



Εικόνα 35: Ιστολογικές τομές μετά από χρώση *CD31* αντιπροσωπευτικών προσαγωγών μυών από ισχαιμικά άκρα 40 μέρες μετά τον εμβολισμό. Οι εικόνες των άκρων που έχουν λάβει θεραπεία με *NGF* (α) και θρομβίνη (β) απεικονίζονται (μεγέθυνση Χ20). Τα μαύρα βέλη δείχνουν τα αρτηριόλια. Σχετικά μεγάλος αριθμός αρτηριολίων απεικονίζεται στην ομάδα της θρομβίνης, συγκριτικά με την ομάδα του *NGF*.

vi. Συμπέρασμα

Συμπερασματικά η μόνη ουσία η οποία προκάλεσε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αρτηριογένεση, όπως αυτή απεικονίστηκε στην αγγειογραφία και επιβεβαιώθηκε με την ιστολογική ανάλυση είναι η θρομβίνη. Οι λοιπές ουσίες, τόσο ο *NGF*, όσο και οι αναστολείς των υποδοχέων, δεν προκάλεσαν αξιόλογες μεταβολές στην αρτηριογένεση μετά από πρόκληση ισχαιμίας, δείχνοντας ότι ενώ εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης, δεν φαίνεται να επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την αρτηριογένεση.

Γ. Συζήτηση

Ο NGF είναι μία ουσία που ενώ έχει δείξει στο παρελθόν αγγειογενετική δράση δεν έχει δοκιμαστεί ποτέ σε μοντέλο ισχαιμίας μεγάλου ζώου και για αυτό το λόγο επιλέχτηκε να μελετηθεί με την παρούσα έρευνα. Το κύριο συμπέρασμα της μελέτης μας είναι ότι η ενδομυϊκή έγχυση NGF, οδηγεί σε σημαντική βελτίωση της ιστικής αιμάτωσης, όπως αυτή υπολογίζεται με την αξονική τομογραφία αιμάτωσης, χωρίς ωστόσο να προκαλεί αγγειογραφικά ορατή αύξηση του αριθμού των αγγείων. Αυτό σημαίνει ότι η επίδραση του NGF περιορίζεται στην ανάπτυξη νέων τριχοειδών και όχι μεγάλων παράπλευρων αγγείων. Αντίθετα η θρομβίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας προκάλεσε την αύξηση τόσο της ιστικής αιμάτωσης, όσο και του αριθμού των μεγάλων αγγείων και άρα πρόκειται για έναν παράγοντα που προκαλεί τόσο αγγειογένεση, όσο και αρτηριογένεση.

Τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά με τις προηγούμενες μελέτες σε μοντέλο χοριοαλλαντικής μεμβράνης εμβρύου κοτόπουλου [90], στο οποίο ο NGF προκάλεσε την επαγωγή της δημιουργίας μικρών τριχοειδών, σε αντίθεση με τον VEGF και τον bFGF, ο οποίοι αμφότεροι προκάλεσαν αρτηριογένεση, επάγοντας την ανάπτυξη μεγάλων αρτηριακών κλάδων. Επιπρόσθετα τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν τις προηγούμενες αναφορές για επαγωγή της αγγειογένεσης από τον NGF σε ισχαιμικά οπίσθια άκρα ποντικών [100, 102, 103, 276] και επιβεβαιώνουν αυτήν την ιδιότητα σε μοντέλο ισχαιμίας μεγαλύτερου ζώου. Εντούτοις, στις αναφερόμενες προηγούμενες μελέτες οι διάμετροι των αρτηριολίων η δημιουργία των οποίων υποβοηθήθηκε από τον NGF, δεν είχε αναφερθεί. Η μελέτη μας είναι η πρώτη που

διαχωρίζει την επίδραση του NGF στις δύο διαφορετικές διαδικασίες δημιουργίας νέων αγγείων, αποδεικνύοντας την αγγειογενετική, αλλά όχι αρτηριογενετική δράση της.

Η δυναμική απεικόνιση και ποσοτικοποίηση των αγγειακών δικτύων *in vivo*, είναι σήμερα διαδικασίες, οι οποίες βρίσκονται στην καθημερινή κλινική πράξη στις αγγειογενετικές και αντιαγγειογενετικές θεραπείες. Η ψηφιακή αφαιρετική αγγειογραφία θεωρείται η μέθοδος εκλογής για την απεικόνιση του αγγειακού δικτύου. Το βασικό της πλεονέκτημα είναι να ανιχνεύει τόσο την αύξηση, ή τη μείωση της πυκνότητας των αγγείων στους προς μελέτη ιστούς, όσο και τη διάμετρο αυτών των αγγείων.

Στην παρούσα μελέτη η αρτηριογένεση εκτιμήθηκε με την ποσοτικοποίηση των μεγάλων παράπλευρων αρτηριών, διαμέτρου μεγαλύτερης των 500 μ m. Με βάση αυτή την παραδοχή ο NGF δεν προκάλεσε την επαγωγή αρτηριολίων. Ωστόσο από λειτουργική άποψη ο NGF προήγαγε τη δημιουργία τριχοειδικών αγγείων και ήταν αποτελεσματικός στο να προκαλέσει στατιστικά σημαντική αύξηση στην αιματική ροή στην περιφερική κυκλοφορία των άκρων, όπως αυτό αντικατοπτρίζεται από την αύξηση της αιματικής ροής και του όγκου αίματος στην αξονική τομογραφία αιμάτωσης.

Εξάλλου είναι σημαντικό ότι πρώτη φορά μελετήθηκαν αυτές οι ιδιότητες του NGF σε ένα μεγάλο ζώο όπως ο κόνικλος, που προσεγγίζει περισσότερο την ανθρώπινη ανατομία και φυσιολογία. Πρόκειται για ένα πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιείται ευρέως στην αγγειογένεση με πολλά πλεονεκτήματα, όπως η ευχερής φύλαξη, περιποίηση και αναισθητοποίηση του ζώου και η δυνατότητα χρήσης ενδαγγειακών τεχνικών, μέσω της διαωτιαίας πρόσβασης.

Ο δευτερεύων στόχος της μελέτης ήταν να διασαφηνίσει τις φαρμακολογικές οδούς, μέσω των οποίων ο NGF βελτιώνει την αιμοδυναμική αποκατάσταση στα ισχαιμικά άκρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης φάνηκε, ότι ο NGF αυξάνει την αιμάτωση, τόσο μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης του με τον υποδοχέα του *trkA*, όσο και έμμεσα, μέσω της απελευθέρωσης VEGF και της ενεργοποίησης μέσω αυτού του υποδοχέα VEGFR2. Αν και υπήρχαν ενδείξεις για αυτόν τον μηχανισμό δράσης είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται σε *in vivo* μοντέλο μεγάλου ζώου. Ο Emanueli και οι συνεργάτες του [103] έχουν αποδείξει ότι η έκφραση του NGF όσο και του υποδοχέα του *trkA*, αυξάνεται σημαντικά μετά από πρόκληση ισχαιμίας σε προσαγωγούς μυς οπίσθιων άκρων ποντικών. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν σε εγκέφαλο ποντικών, μετά από παροδική εστιακή ισχαιμία [277], καθώς και σε ποντίκια με μυοκαρδιακή ισχαιμία [101]. Επιπλέον, πρόσφατα οι συνεργάτες μας έδειξαν την προστατευτική επίδραση του NGF, μέσω των υποδοχέων *trkA* και της καταστολής των οδών Erk, Akt και PLCγ σε ενδοθηλιακά κύτταρα από τριχοειδή εγκέφαλου ποντικών, τα οποία είχαν υποστεί στέρηση οξυγόνου και γλυκόζης [278, 279].

Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, η αναστολή της ενεργοποίησης του *TrkA*, μέσω του K252a που είναι αναστολέας του υποδοχέα του, προκάλεσε αναστολή της αγγειογενετικής δράσης του NGF σε μοντέλο ισχαιμίας οπίσθιων άκρων κόνικλων στο πείραμά μας, καταδεικνύοντας τη σημασία του υποδοχέα *trkA* στην αγγειογενετική δράση του NGF.

Με βάση τις επιδράσεις του NGF και του VEGF στο νευρικό και το καρδιαγγειακό σύστημα [91], δεν αποτελεί έκπληξη ότι στην αγγειογένεση που προκαλεί ο NGF, μεσολαβεί και ο VEGF. Η χορήγηση

SU5416 στην μελέτη μας μείωσε την ιστική αιμάτωση , δείχνοντας ότι η θεραπεία με NGF πιθανώς επάγει την απελευθέρωση VEGF από τον ισχαιμικό ιστό, γεγονός που με τη σειρά του συμβάλει στην αγγειογενετική επίδραση, όπως αυτό έχει φανεί και σε προηγούμενες μελέτες σε ποντίκια [103].

Ποικίλοι άλλοι μηχανισμοί μπορεί επίσης να εμπλέκονται στην αγγειακή επίδραση του NGF. Ο NGF είναι τόσο τροφικός, όσο και προστατευτικός παράγοντας για τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών. Επιπρόσθετα πρόσφατα σε μελέτη των συνεργατών μας φάνηκε ότι ο NGF παρέχει προφύλαξη *in vitro* σε C2C12 σκελετικά μυϊκά κύτταρα που εκτέθηκαν σε στέρηση γλυκόζης και οξυγόνου [280], υποδηλώνοντας ότι ο NGF μπορεί να δρα επωφελώς στον μεταβολισμό των μυϊκών κυττάρων που εκτίθενται σε ισχαιμία. Δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι η αγγειογενετική επίδραση του NGF, η οποία ανιχνεύθηκε με την αύξηση της αιματικής ροής, βοήθησε επίσης στην προφύλαξη από εκτεταμένη απώλεια μυϊκού ιστού στα οπίσθια ισχαιμικά άκρα. Η εξωγενής χορήγηση NGF στα ισχαιμικά οπίσθια άκρα κονίκλων φαίνεται ότι προκαλεί την εκκίνηση μίας σειράς αυτοκρινών/παρακρινικών γεγονότων, τα οποία συμπεριλαμβάνουν τους ενδογενείς NGF και VEGF, καθώς και άλλους μεσολαβητές. Το αποτέλεσμα όλων αυτών των διαδικασιών είναι η αιμοδυναμική ανάρρωση των ισχαιμικών άκρων των κονίκλων μέσω των οδών που εξαρτώνται από τους υποδοχείς trkA- και VEGFR2-.

Ο πρωταρχικός στόχος της θεραπευτικής αγγειογένεσης είναι η αύξηση του αριθμού των παράπλευρων αγγείων, τα οποία θα βελτιώσουν τελικά την αιματική ροή στον ισχαιμικό ιστό [281]. Για να είναι επιτυχής η θεραπευτική αγγειογένεση απαιτείται συνδυασμός της

αγγειογένεσης και της αρτηριογένεσης, καθώς αμφότερες οι διεργασίες είναι απαραίτητες για να δημιουργηθούν λειτουργικά παράπλευρα αγγεία [282]. Οι διακριτοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί της αγγειογένεσης και της αρτηριογένεσης με διαφορετικούς αγγειακούς μεσολαβητές δείχνουν ότι συνδυασμός αγγειογενετικών και αρτηριογενετικών παραγόντων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για θεραπεία. Μέχρι σήμερα, όλες οι μεγάλες μελέτες σχεδιάζονται ως δοκιμές ενός παράγοντα, ως μονοθεραπεία και τα αποτελέσματά τους δεν είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, πιθανότατα επειδή η χορήγηση μόνο αγγειογενετικού ή αρτηριογενετικού παράγοντα δεν αρκεί για την de novo δημιουργία λειτουργικού αρτηριακού δικτύου [283]. Νέες προκλινικές μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα ότι ο συνδυασμός αγγειογενετικών και αρτηριογενετικών παραγόντων βελτιώνει συνεργικά το λειτουργικό αποτέλεσμα στους ισχαιμικούς ιστούς και όργανα [284].

Ο συνδυασμός αγγειογενετικών και αρτηριογενετικών παραγόντων για τη βελτίωση της αγγειογένεσης και της ιστικής αιμάτωσης δοκιμάστηκε σε διάφορα μοντέλα ζώων. Σε μοντέλο ισχαιμίας οπισθίων άκρων κονίκλων και μυών, η ταυτόχρονη χορήγηση FGF-2 και PDGF βελτίωσε σημαντικά το σχηματισμό παράπλευρου αρτηριακού δικτύου και την αιματική διήθηση [285]. Η μικρής χρονικής διάρκειας χορήγηση δύο παραγόντων σε ισχαιμικούς σκελετικούς μύες, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό παράπλευρου αρτηριακού δικτύου, το οποίο είχε μεγάλη διάρκεια ζωής και αποτελούνταν από μεγάλης διαμέτρου αγγεία που παρείχαν ικανοποιητική αιματική ροή. Αντίθετα η μονοθεραπεία με έναν αγγειογενετικό παράγοντα είχε ως αποτέλεσμα παροδική μόνο αύξηση της αιματικής ροής [285-287].

Συνδυασμός άλλων αγγειογενετικών και αρτηριογενετικών παραγόντων, όπως PDGF με VEGF [288], VEGF με αγγειοποιητίνη-142[289], ή αυξητικό παράγοντα των κοκκιοκυττάρων (granulocyte-colony stimulating factor) με ηπατοκυτταρικό αυξητικό παράγοντα (HGF)[290], προκάλεσε συνεργικά βελτίωση της λειτουργικής ανάρρωσης σε ιστό ισχαιμικών μυών. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα είναι λογικό να προτείνεται ο NGF ως ένας επιπρόσθετος δυνητικά χρήσιμος παράγοντας στη θεραπευτική αγγειογένεση για να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τον VEGF, τον FGF και άλλους αγγειογενετικούς/αρτηριογενετικούς παράγοντες, όπως η θρομβίνη. Πραγματικά, σε μία πρώτη κλινική δοκιμή σε ένα παιδί με σύνδρομο καταπλάκωσης κάτω άκρου, ο NGF έδειξε θετική αγγειογενετική επίδραση [291, 292]. Επίσης, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι άλλες νευροτροπίνες, όπως ο προερχόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροπικός παράγοντας και η νευροτροπίνη-3, έχουν επίσης χαρακτηριστεί αγγειογενετικοί παράγοντες [293], ικανοί για θεραπευτική αγγειογένεση σε μοντέλο ισχαιμίας άκρων μυών [294] είναι λογικό να συμπεριληφθούν και αυτοί σε κλινικές δοκιμές.

Υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στην μελέτη μας. Η μελέτη της αιμοδυναμικής ανάρρωσης και της αρτηριογένεσης έγινε σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή, την 40^η ημέρα μετά τον εμβολισμό, 20 μέρες μετά την τελευταία έγχυση του NGF. Παρότι πολλοί ερευνητές έχουν ακολουθήσει παρόμοιο πρωτόκολλο, είναι πιθανόν το μεγάλο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί να αποκρύπτει μέρος της αγγειογενετικής επίδρασης του NGF.

Επιπρόσθετα, η αδυναμία του NGF να επάγει την αρτηριογένεση θα μπορούσε να αποδοθεί στη δοσολογία που χρησιμοποιήθηκε.

Ωστόσο, ο στόχος της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση του NGF σε δοσολογία που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Από την άλλη πλευρά η θεραπευτική αγγειογένεση είναι αποδοτική μόνο αν δημιουργηθούν σταθερές αρτηρίες. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι τα νέα παράπλευρα δίκτυα απαιτούν έως 20 ημέρες για να αναπτυχθούν πλήρως μετά την ισχαιμική προσβολή, είναι πιθανό, ότι περισσότερες επαναλαμβανόμενες εγχύσεις μικρότερων δόσεων ή σταθερή απελευθέρωση NGF με κάποιο βιοαποδομούμενο σύστημα χορήγησης θα ήταν προτιμότερα από 3 εγχύσεις υψηλών δόσεων.

Συμπερασματικά, τα στοιχεία μας δείχνουν ότι η εξωγενής χορήγηση NGF σε ισχαιμικά οπίσθια άκρα κονίκλων, έχει σημαντικό αποτέλεσμα στην αγγειογένεση, αλλά όχι στην αρτηριογένεση και επάγει την αιμοδυναμική ανάρρωση μέσω των οδών που εξαρτώνται από τους υποδοχείς trkA- και VEGFR2. Άρα η μελέτη μας προσφέρει νέα δεδομένα στην φαρμακολογική δράση του NGF στην αγγειογένεση και παρέχει στοιχεία για την αγγειογενετική δυναμική της ουσίας σε περιφερική ισχαιμία ενός μεγάλου πειραματόζωου.

Δ. Βιβλιογραφία

1. Norgren, L., et al., *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)*. J Vasc Surg, 2007. **45 Suppl S**: p. S5-67.
2. Newman, A.B., et al., *Morbidity and mortality in hypertensive adults with a low ankle/arm blood pressure index*. JAMA, 1993. **270**(4): p. 487-9.
3. Sigvant, B., et al., *A population-based study of peripheral arterial disease prevalence with special focus on critical limb ischemia and sex differences*. J Vasc Surg, 2007. **45**(6): p. 1185-91.
4. Kroger, K., et al., *Prevalence of peripheral arterial disease - results of the Heinz Nixdorf recall study*. Eur J Epidemiol, 2006. **21**(4): p. 279-85.
5. Kannel, W.B. and D.L. McGee, *Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study*. J Am Geriatr Soc, 1985. **33**(1): p. 13-8.
6. Murabito, J.M., et al., *Temporal trends in the incidence of intermittent claudication from 1950 to 1999*. Am J Epidemiol, 2005. **162**(5): p. 430-7.
7. Fowkes, F.G., et al., *Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study*. Am J Epidemiol, 1992. **135**(4): p. 331-40.
8. Criqui, M.H., *Peripheral arterial disease--epidemiological aspects*. Vasc Med, 2001. **6**(3 Suppl): p. 3-7.
9. Ingolfsson, I.O., et al., *A marked decline in the prevalence and incidence of intermittent claudication in Icelandic men 1968-1986: a strong relationship to smoking and serum cholesterol--the Reykjavik Study*. J Clin Epidemiol, 1994. **47**(11): p. 1237-43.
10. Stoffers, H.E., et al., *The prevalence of asymptomatic and unrecognized peripheral arterial occlusive disease*. Int J Epidemiol, 1996. **25**(2): p. 282-90.
11. Meijer, W.T., et al., *Peripheral arterial disease in the elderly: The Rotterdam Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(2): p. 185-92.
12. Ridker, P.M., M.J. Stampfer, and N. Rifai, *Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein,*

- fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. JAMA, 2001. 285(19): p. 2481-5.*
13. Tendera, M., et al., *ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J, 2011. 32(22): p. 2851-906.*
 14. Lijmer, J.G., et al., *ROC analysis of noninvasive tests for peripheral arterial disease. Ultrasound Med Biol, 1996. 22(4): p. 391-8.*
 15. Koelemay, M.J., et al., *Diagnosis of arterial disease of the lower extremities with duplex ultrasonography. Br J Surg, 1996. 83(3): p. 404-9.*
 16. Visser, K. and M.G. Hunink, *Peripheral arterial disease: gadolinium-enhanced MR angiography versus color-guided duplex US--a meta-analysis. Radiology, 2000. 216(1): p. 67-77.*
 17. Collins, R., et al., *A systematic review of duplex ultrasound, magnetic resonance angiography and computed tomography angiography for the diagnosis and assessment of symptomatic, lower limb peripheral arterial disease. Health Technol Assess, 2007. 11(20): p. iii-iv, xi-xiii, 1-184.*
 18. Met, R., et al., *Diagnostic performance of computed tomography angiography in peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis. JAMA, 2009. 301(4): p. 415-24.*
 19. Bendermacher, B.L., et al., *Supervised exercise therapy versus non-supervised exercise therapy for intermittent claudication. Cochrane Database Syst Rev, 2006(2): p. CD005263.*
 20. Hiatt, W.R., et al., *Superiority of treadmill walking exercise versus strength training for patients with peripheral arterial disease. Implications for the mechanism of the training response. Circulation, 1994. 90(4): p. 1866-74.*
 21. Watson, L., B. Ellis, and G.C. Leng, *Exercise for intermittent claudication. Cochrane Database Syst Rev, 2008(4): p. CD000990.*
 22. Gardner, A.W. and E.T. Poehlman, *Exercise rehabilitation programs for the treatment of claudication pain. A meta-analysis. JAMA, 1995. 274(12): p. 975-80.*
 23. Momsen, A.H., et al., *Drug therapy for improving walking distance in intermittent claudication: a systematic review and meta-*

- analysis of robust randomised controlled studies.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 2009. **38**(4): p. 463-74.
24. Pande, R.L., et al., *A pooled analysis of the durability and predictors of treatment response of cilostazol in patients with intermittent claudication.* Vasc Med, 2010. **15**(3): p. 181-8.
 25. Lehert, P., et al., *Naftidrofuryl in intermittent claudication: a retrospective analysis.* J Cardiovasc Pharmacol, 1994. **23 Suppl 3**: p. S48-52.
 26. De Backer, T., et al., *Naftidrofuryl for intermittent claudication: meta-analysis based on individual patient data.* BMJ, 2009. **338**: p. b603.
 27. Spengel, F., et al., *Findings of the Naftidrofuryl in Quality of Life (NIQOL) European study program.* Int Angiol, 2002. **21**(1): p. 20-7.
 28. Wolfe, J.H. and M.G. Wyatt, *Critical and subcritical ischaemia.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997. **13**(6): p. 578-82.
 29. Taylor, S.M., et al., *Critical analysis of clinical success after surgical bypass for lower-extremity ischemic tissue loss using a standardized definition combining multiple parameters: a new paradigm of outcomes assessment.* J Am Coll Surg, 2007. **204**(5): p. 831-8; discussion 838-9.
 30. Liddell, R.P., C.R. Weiss, and L.V. Hofmann, *Therapeutic angiogenesis: the next frontier for interventional radiology.* Tech Vasc Interv Radiol, 2004. **7**(1): p. 40-8.
 31. Bussolino, F., A. Mantovani, and G. Persico, *Molecular mechanisms of blood vessel formation.* Trends Biochem Sci, 1997. **22**(7): p. 251-6.
 32. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis.* Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
 33. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.* Science, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
 34. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.* Circ Res, 1999. **85**(3): p. 221-8.
 35. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization.* Nat Med, 1999. **5**(4): p. 434-8.
 36. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis.* J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10931-4.

37. Swift, M.E., H.K. Kleinman, and L.A. DiPietro, *Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice*. Laboratory Investigation, 1999. **79**(12): p. 1479-1487.
38. Folkman, J., *What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent*. Journal of the National Cancer Institute, 1990. **82**(1): p. 4-6.
39. Giatromanolaki, A., et al., *The angiogenic pathway 'vascular endothelial growth factor/flk-1 (KDR)-receptor' in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Journal of Pathology, 2001. **194**(1): p. 101-108.
40. Veves, A. and G.L. King, *Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects?* Journal of Clinical Investigation, 2001. **107**(10): p. 1215-1218.
41. Semenza, G.L., *Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 17-28.
42. Iba, O., et al., *Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs*. Circulation, 2002. **106**(15): p. 2019-25.
43. Etoh, T., et al., *Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2145-53.
44. Hirschi, K.K., S.A. Rohovsky, and P.A. D'Amore, *PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate*. J Cell Biol, 1998. **141**(3): p. 805-14.
45. Takeshita, S., et al., *Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model*. J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 662-70.
46. Baumgartner, I., et al., *Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia*. Circulation, 1998. **97**(12): p. 1114-23.
47. Schumacher, B., et al., *Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease*. Circulation, 1998. **97**(7): p. 645-50.
48. Buschmann, I. and W. Schaper, *The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis)*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 338-42.

49. Schaper, W., *Control of coronary angiogenesis*. Eur Heart J, 1995. **16 Suppl C**: p. 66-8.
50. Deindl, E., et al., *Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit*. Circ Res, 2001. **89**(9): p. 779-86.
51. Gloe, T., et al., *Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin alpha(v)beta3*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23453-8.
52. Walpola, P.L., et al., *Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(1): p. 2-10.
53. Wolf, C., et al., *Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(11): p. 2291-305.
54. Ouma, G.O., et al., *Targets and delivery methods for therapeutic angiogenesis in peripheral artery disease*. Vasc Med. **17**(3): p. 174-92.
55. Levi-Montalcini, R., *The nerve growth factor 35 years later*. Science, 1987. **237**(4819): p. 1154-62.
56. Tabakman, R., et al., *Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury*. Prog Brain Res, 2004. **146**: p. 387-401.
57. Cassiman, D., et al., *Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors*. Hepatology, 2001. **33**(1): p. 148-58.
58. Aloe, L., et al., *The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases*. Allergy, 1997. **52**(9): p. 883-94.
59. Matsuda, H., et al., *Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice*. J Exp Med, 1998. **187**(3): p. 297-306.
60. Bernabei, R., et al., *Effect of topical application of nerve-growth factor on pressure ulcers*. Lancet, 1999. **354**(9175): p. 307.
61. Tuveri, M., et al., *NGF, a useful tool in the treatment of chronic vasculitic ulcers in rheumatoid arthritis*. Lancet, 2000. **356**(9243): p. 1739-40.
62. Chao, M.V. and B.L. Hempstead, *p75 and Trk: a two-receptor system*. Trends Neurosci, 1995. **18**(7): p. 321-6.

63. Kaplan, D.R., D. Martin-Zanca, and L.F. Parada, *Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF*. *Nature*, 1991. **350**(6314): p. 158-60.
64. Rodriguez-Tebar, A., et al., *Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor*. *EMBO J*, 1992. **11**(3): p. 917-22.
65. Beutler, B. and C. van Huffel, *Unraveling function in the TNF ligand and receptor families*. *Science*, 1994. **264**(5159): p. 667-8.
66. Kaplan, D.R. and F.D. Miller, *Neurotrophin signal transduction in the nervous system*. *Curr Opin Neurobiol*, 2000. **10**(3): p. 381-91.
67. McDonald, N.Q., et al., *New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor*. *Nature*, 1991. **354**(6352): p. 411-4.
68. Wiesmann, C. and A.M. de Vos, *Nerve growth factor: structure and function*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(5-6): p. 748-59.
69. Angeletti, R.H., R.A. Bradshaw, and R.D. Wade, *Subunit structure and amino acid composition of mouse submaxillary gland nerve growth factor*. *Biochemistry*, 1971. **10**(3): p. 463-9.
70. Edwards, R.H., et al., *Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(14): p. 6810-5.
71. Jongstra-Bilen, J., L. Coblentz, and E.M. Shooter, *The in vitro processing of the NGF precursors by the gamma-subunit of the 7S NGF complex*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1989. **5**(2): p. 159-69.
72. Bax, B., et al., *Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins*. *Structure*, 1997. **5**(10): p. 1275-85.
73. Silverman, R.E. and R.A. Bradshaw, *Nerve growth factor: subunit interactions in the mouse submaxillary gland 7S complex*. *J Neurosci Res*, 1982. **8**(2-3): p. 127-36.
74. Schneider, R. and M. Schweiger, *A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors*. *Oncogene*, 1991. **6**(10): p. 1807-11.
75. Lamballe, F., R. Klein, and M. Barbacid, *trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3*. *Cell*, 1991. **66**(5): p. 967-79.

76. Holden, P.H., et al., *Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(7): p. 668-72.
77. Urfer, R., et al., *An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors*. EMBO J, 1995. **14**(12): p. 2795-805.
78. Cantarella, G., et al., *Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo*. FASEB J, 2002. **16**(10): p. 1307-9.
79. Steinle, J.J. and H.J. Granger, *Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation*. Auton Neurosci, 2003. **108**(1-2): p. 57-62.
80. Raychaudhuri, S.K., et al., *Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells*. Arch Dermatol Res, 2001. **293**(6): p. 291-5.
81. Moser, K.V., et al., *Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation*. Brain Res, 2004. **1017**(1-2): p. 53-60.
82. Tanaka, A., et al., *An autocrine function of nerve growth factor for cell cycle regulation of vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(4): p. 1009-14.
83. Rahbek, U.L., et al., *Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration*. Pflugers Arch, 2005. **450**(5): p. 355-61.
84. Dolle, L., et al., *Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells*. Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5592-601.
85. Katzir, I., et al., *Characterization of nerve growth factors (NGFs) from snake venoms by use of a novel, quantitative bioassay utilizing pheochromocytoma (PC12) cells overexpressing human trkA receptors*. Toxicon, 2003. **42**(5): p. 481-90.
86. Hayashi, K., S. Inoue, and K. Ikeda, *Purification and characterization of nerve growth factors (NGFs) from the snake venoms*. Adv Exp Med Biol, 1996. **391**: p. 403-16.
87. Ribatti, D., A. Vacca, and F. Dammacco, *The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review*. Neoplasia, 1999. **1**(4): p. 293-302.
88. Ribatti, D., M.T. Conconi, and G.G. Nussdorfer, *Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis*. Pharmacol Rev, 2007. **59**(2): p. 185-205.

89. Seo, K., et al., *Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas*. J Vet Sci, 2001. **2**(2): p. 125-30.
90. Lazarovici, P., et al., *Nerve growth factor (NGF) promotes angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane*. Endothelium, 2006. **13**(1): p. 51-9.
91. Lazarovici, P., C. Marcinkiewicz, and P.I. Lelkes, *Cross talk between the cardiovascular and nervous systems: neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenic effects of nerve growth factor (NGF)-implications in drug development*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(21): p. 2609-22.
92. Nico, B., et al., *Nerve growth factor as an angiogenic factor*. Microvasc Res, 2008. **75**(2): p. 135-41.
93. Levi-Montalcini, R., et al., *Nerve growth factor induces volume increase and enhances tyrosine hydroxylase synthesis in chemically axotomized sympathetic ganglia of newborn rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(2): p. 595-9.
94. Angeletti, P.U. and R. Levi-Montalcini, *Sympathetic nerve cell destruction in newborn mammals by 6-hydroxydopamine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **65**(1): p. 114-21.
95. Calza, L., et al., *Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 4160-5.
96. Santos, P.M., et al., *Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1991. **105**(1): p. 12-25.
97. Hansen-Algenstaedt, N., et al., *Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor*. Histochem Cell Biol, 2006. **125**(6): p. 637-49.
98. Julio-Pieper, M., et al., *Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta1 in the rat ovary*. Reprod Biol Endocrinol, 2006. **4**: p. 57.
99. Nissen, N.N., et al., *Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing*. Am J Pathol, 1998. **152**(6): p. 1445-52.
100. Graiani, G., et al., *Nerve growth factor promotes reparative angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis in cutaneous wounds of Type 1 diabetic mice*. Diabetologia, 2004. **47**(6): p. 1047-54.

101. Hiltunen, J.O., et al., *Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion*. J Pathol, 2001. **194**(2): p. 247-53.
102. Turrini, P., et al., *Nerve growth factor induces angiogenic activity in a mouse model of hindlimb ischemia*. Neurosci Lett, 2002. **323**(2): p. 109-12.
103. Emanuelli, C., et al., *Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs*. Circulation, 2002. **106**(17): p. 2257-62.
104. Fidler, I.J. and L.M. Ellis, *The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis*. Cell, 1994. **79**(2): p. 185-8.
105. Lavoie, J.F., et al., *TrkA induces apoptosis of neuroblastoma cells and does so via a p53-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 29199-207.
106. Matsushima, H. and E. Bogenmann, *Nerve growth factor (NGF) induces neuronal differentiation in neuroblastoma cells transfected with the NGF receptor cDNA*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(9): p. 5015-20.
107. Nakagawara, A., *The NGF story and neuroblastoma*. Med Pediatr Oncol, 1998. **31**(2): p. 113-5.
108. Nakagawara, A., et al., *Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma*. N Engl J Med, 1993. **328**(12): p. 847-54.
109. Azar, C.G., et al., *Multiple defects of the nerve growth factor receptor in human neuroblastomas*. Cell Growth Differ, 1990. **1**(9): p. 421-8.
110. Nakagawara, A., *Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development*. Cancer Lett, 2001. **169**(2): p. 107-14.
111. Nakagawara, A., et al., *Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas*. Cancer Res, 1992. **52**(5): p. 1364-8.
112. Tacconelli, A., et al., *TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma*. Cancer Cell, 2004. **6**(4): p. 347-60.
113. Singer, H.S., et al., *Mitogenesis in glioblastoma multiforme cell lines: a role for NGF and its TrkA receptors*. J Neurooncol, 1999. **45**(1): p. 1-8.

114. Okada, Y., et al., *Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells*. Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(4): p. 285-92.
115. Dolle, L., et al., *Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2004. **4**(6): p. 463-70.
116. Davidson, B., et al., *Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(6): p. 2248-59.
117. Middeke, M., et al., *In vitro and in vivo angiogenesis in PC12 pheochromocytoma cells is mediated by vascular endothelial growth factor*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2002. **110**(8): p. 386-92.
118. Di Cera, E., *Thrombin interactions*. Chest, 2003. **124**(3 Suppl): p. 11S-7S.
119. Esmon, C.T., *The protein C pathway*. Chest, 2003. **124**(3 Suppl): p. 26S-32S.
120. Gettins, P.G., *Serpin structure, mechanism, and function*. Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4751-804.
121. Olson, S.T. and Y.J. Chuang, *Heparin activates antithrombin anticoagulant function by generating new interaction sites (exosites) for blood clotting proteinases*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(8): p. 331-8.
122. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
123. Dvorak, H.F., *Angiogenesis: update 2005*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1835-42.
124. Rickles, F.R., S. Patierno, and P.M. Fernandez, *Tissue factor, thrombin, and cancer*. Chest, 2003. **124**(3 Suppl): p. 58S-68S.
125. Eming, S.A., et al., *Regulation of angiogenesis: wound healing as a model*. Prog Histochem Cytochem, 2007. **42**(3): p. 115-70.
126. Wojtukiewicz, M.Z., E. Sierko, and J. Rak, *Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(1): p. 5-20.
127. Daubie, V., et al., *Tissue factor: a mini-review*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(3): p. 161-9.
128. Sawada, M., et al., *Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis*. Br J Cancer, 1999. **79**(3-4): p. 472-7.

129. Ueno, T., et al., *Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration*. Br J Cancer, 2000. **83**(2): p. 164-70.
130. Nakasaki, T., et al., *Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer*. Am J Hematol, 2002. **69**(4): p. 247-54.
131. Guan, M., et al., *Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma*. Clin Biochem, 2002. **35**(4): p. 321-5.
132. Zhang, Y., et al., *Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1320-7.
133. Abe, K., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8663-8.
134. Versteeg, H.H. and W. Ruf, *Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events*. Semin Thromb Hemost, 2006. **32**(1): p. 24-32.
135. Belting, M., et al., *Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 502-9.
136. Suzuki, K. and T. Hayashi, *Protein C and its inhibitor in malignancy*. Semin Thromb Hemost, 2007. **33**(7): p. 667-72.
137. Uchiba, M., et al., *Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo*. Circ Res, 2004. **95**(1): p. 34-41.
138. Asanuma, K., et al., *Protein C inhibitor inhibits breast cancer cell growth, metastasis and angiogenesis independently of its protease inhibitory activity*. Int J Cancer, 2007. **121**(5): p. 955-65.
139. Tsopanoglou, N.E. and M.E. Maragoudakis, *Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(1): p. 63-9.
140. Tsopanoglou, N.E., E. Pipili-Synetos, and M.E. Maragoudakis, *Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation*. Am J Physiol, 1993. **264**(5 Pt 1): p. C1302-7.
141. Haralabopoulos, G.C., et al., *Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 1): p. C239-45.
142. Tsopanoglou, N.E. and M.E. Maragoudakis, *Thrombin's central role in angiogenesis and pathophysiological processes*. Eur Cytokine Netw, 2009. **20**(4): p. 171-9.

143. Caunt, M., et al., *Thrombin induces neoangiogenesis in the chick chorioallantoic membrane*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(10): p. 2097-102.
144. Huang, Y.Q., et al., *Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes*. Thromb Haemost, 2001. **86**(4): p. 1094-8.
145. Huang, Y.Q., et al., *Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1646-50.
146. Tsopanoglou, N.E. and M.E. Maragoudakis, *On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 23969-76.
147. Dupuy, E., et al., *Thrombin induces angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in human endothelial cells: possible relevance to HIF-1alpha*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(5): p. 1096-102.
148. Gorlach, A., et al., *Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. 47-54.
149. Olivot, J.M., et al., *Thrombomodulin prolongs thrombin-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and nuclear retention in endothelial cells*. Circ Res, 2001. **88**(7): p. 681-7.
150. Martorell, L., et al., *Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is induced by thrombin and mediates vascular endothelial cell growth*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(8): p. 1766-73.
151. Tsopanoglou, N.E. and M.E. Maragoudakis, *On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: inhibition of attachment of endothelial cells on basement membrane components*. Angiogenesis, 1998. **1**(2): p. 192-200.
152. Fernandez-Patron, C., et al., *Rapid release of matrix metalloproteinase (MMP)-2 by thrombin in the rat aorta: modulation by protein tyrosine kinase/phosphatase*. Thromb Haemost, 1999. **82**(4): p. 1353-7.
153. Zania, P., et al., *Parstatin, the cleaved peptide on proteinase-activated receptor 1 activation, is a potent inhibitor of angiogenesis*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **328**(2): p. 378-89.

154. Strande, J.L., et al., *Parstatin: a cryptic peptide involved in cardioprotection after ischaemia and reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 325-34.
155. Laurens, N., P. Koolwijk, and M.P. de Maat, *Fibrin structure and wound healing*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(5): p. 932-9.
156. Koolwijk, P., et al., *Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity*. J Cell Biol, 1996. **132**(6): p. 1177-88.
157. Medved, L., G. Tsurupa, and S. Yakovlev, *Conformational changes upon conversion of fibrinogen into fibrin. The mechanisms of exposure of cryptic sites*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **936**: p. 185-204.
158. Martinez, J., et al., *Interaction of fibrin with VE-cadherin*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **936**: p. 386-405.
159. Sahni, A., et al., *Fibrinogen and fibrin protect fibroblast growth factor-2 from proteolytic degradation*. Thromb Haemost, 2000. **83**(5): p. 736-41.
160. Bar-Shavit, R., A. Eldor, and I. Vlodavsky, *Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix. Protection and expression of functional properties*. J Clin Invest, 1989. **84**(4): p. 1096-104.
161. Papaconstantinou, M.E., et al., *Thrombin functions through its RGD sequence in a non-canonical conformation*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29393-6.
162. Smadja, D.M., et al., *Thrombin bound to a fibrin clot confers angiogenic and haemostatic properties on endothelial progenitor cells*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(3): p. 975-86.
163. Flynn, A.N. and A.G. Buret, *Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis*. Apoptosis, 2004. **9**(6): p. 729-37.
164. Zania, P., et al., *Thrombin mediates mitogenesis and survival of human endothelial cells through distinct mechanisms*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(5): p. C1215-26.
165. Helisch, A. and W. Schaper, *Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries*. Microcirculation, 2003. **10**(1): p. 83-97.
166. Katsanos, K., et al., *Thrombin promotes arteriogenesis and hemodynamic recovery in a rabbit hindlimb ischemia model*. J Vasc Surg, 2009. **49**(4): p. 1000-12.
167. Dimitropoulou, C., M.E. Maragoudakis, and M.A. Konerding, *Effects of thrombin and of the phospholipase C inhibitor, D609, on*

- the vascularity of the chick chorioallantoic membrane. Gen Pharmacol, 2000. 35(5): p. 241-7.*
168. De Paula, E.V., et al., *Early in vivo anticoagulation inhibits the angiogenic response following hindlimb ischemia in a rodent model. Thromb Haemost, 2006. 96(1): p. 68-72.*
 169. Chekanov, V.S., et al., *Direct fibrin injection to promote new collateral growth in hind limb ischemia in a rabbit model. J Card Surg, 2002. 17(6): p. 502-11; discussion 512.*
 170. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors. Nat Med, 2003. 9(6): p. 669-76.*
 171. Makinen, K., et al., *Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. Mol Ther, 2002. 6(1): p. 127-33.*
 172. Bauters, C., et al., *Growth factors and endothelial dysfunction. Drugs, 1999. 59 Spec No: p. 11-5.*
 173. Korc, M. and R.E. Friesel, *The role of fibroblast growth factors in tumor growth. Curr Cancer Drug Targets, 2009. 9(5): p. 639-51.*
 174. Asahara, T., et al., *Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. Circulation, 1995. 92(9 Suppl): p. II365-71.*
 175. Nikol, S., et al., *Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. Mol Ther, 2008. 16(5): p. 972-8.*
 176. Belch, J., et al., *Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. Lancet, 2011. 377(9781): p. 1929-37.*
 177. Bottaro, D.P., et al., *Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. Science, 1991. 251(4995): p. 802-4.*
 178. Matsumoto, K. and T. Nakamura, *Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. J Biochem, 1996. 119(4): p. 591-600.*
 179. Morishita, R., et al., *Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. Hypertension, 1999. 33(6): p. 1379-84.*
 180. Powell, R.J., et al., *Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte*

- growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia.* Circulation, 2008. **118**(1): p. 58-65.
181. Morishita, R., et al., *Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease.* Hypertension, 2004. **44**(2): p. 203-9.
 182. Morishita, R., et al., *Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 713-20.
 183. Penta, K., et al., *Del1 induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of alphaVbeta3.* J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 11101-9.
 184. Brooks, P.C., et al., *Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.* Cell, 1994. **79**(7): p. 1157-64.
 185. Ho, H.K., et al., *Developmental endothelial locus-1 (Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia.* Circulation, 2004. **109**(10): p. 1314-9.
 186. Kown, M.H., et al., *Comparison of developmental endothelial locus-1 angiogenic factor with vascular endothelial growth factor in a porcine model of cardiac ischemia.* Ann Thorac Surg, 2003. **76**(4): p. 1246-51.
 187. Grossman, P.M., et al., *Results from a phase II multicenter, double-blind placebo-controlled study of Del-1 (VLTS-589) for intermittent claudication in subjects with peripheral arterial disease.* Am Heart J, 2007. **153**(5): p. 874-80.
 188. Rey, S. and G.L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling.* Cardiovasc Res, 2010. **86**(2): p. 236-42.
 189. Kelly, B.D., et al., *Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1.* Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1074-81.
 190. Manalo, D.J., et al., *Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1.* Blood, 2005. **105**(2): p. 659-69.
 191. Kaelin, W.G., Jr. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway.* Mol Cell, 2008. **30**(4): p. 393-402.

192. Bosch-Marce, M., et al., *Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia*. *Circ Res*, 2007. **101**(12): p. 1310-8.
193. Patel, T.H., et al., *Constitutively active HIF-1alpha improves perfusion and arterial remodeling in an endovascular model of limb ischemia*. *Cardiovasc Res*, 2005. **68**(1): p. 144-54.
194. Rajagopalan, S., et al., *Use of a constitutively active hypoxia-inducible factor-1alpha transgene as a therapeutic strategy in no-option critical limb ischemia patients: phase I dose-escalation experience*. *Circulation*, 2007. **115**(10): p. 1234-43.
195. Creager, M.A., et al., *Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha gene therapy on walking performance in patients with intermittent claudication*. *Circulation*, 2011. **124**(16): p. 1765-73.
196. Nangaku, M., et al., *A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(12): p. 2548-54.
197. Melnikova, I., *Anaemia therapies*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(8): p. 627-8.
198. Post, M.J., et al., *Adenoviral PR39 improves blood flow and myocardial function in a pig model of chronic myocardial ischemia by enhancing collateral formation*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. **290**(3): p. R494-500.
199. Muinck, E.D., et al., *Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury by the angiogenic Masterswitch protein PR 39 gene therapy: the roles of HIF1alpha stabilization and FGFR1 signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2007. **9**(4): p. 437-45.
200. Natarajan, R., et al., *Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury*. *Circ Res*, 2006. **98**(1): p. 133-40.
201. Dai, S., et al., *Endothelial-specific expression of mitochondrial thioredoxin promotes ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(4): p. 495-502.
202. Kim, W.J., et al., *Antisense-thioredoxin inhibits angiogenesis via pVHL-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha degradation*. *Int J Oncol*, 2005. **26**(4): p. 1049-52.
203. Powis, G. and W.R. Montfort, *Properties and biological activities of thioredoxins*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2001. **30**: p. 421-55.

204. Keaney, J.F., Jr., *Oxidative stress and the vascular wall: NADPH oxidases take center stage*. *Circulation*, 2005. **112**(17): p. 2585-8.
205. Welsh, S.J., et al., *The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis*. *Cancer Res*, 2002. **62**(17): p. 5089-95.
206. Welsh, S.J., et al., *The thioredoxin redox inhibitors 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide and pleurotin inhibit hypoxia-induced factor 1alpha and vascular endothelial growth factor formation*. *Mol Cancer Ther*, 2003. **2**(3): p. 235-43.
207. Samuel, S.M., et al., *Thioredoxin-1 gene therapy enhances angiogenic signaling and reduces ventricular remodeling in infarcted myocardium of diabetic rats*. *Circulation*, 2010. **121**(10): p. 1244-55.
208. Arany, Z., et al., *HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha*. *Nature*, 2008. **451**(7181): p. 1008-12.
209. Chinsomboon, J., et al., *The transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(50): p. 21401-6.
210. Arany, Z., *PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease*. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. **18**(5): p. 426-34.
211. Wende, A.R., et al., *A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(50): p. 36642-51.
212. Rasbach, K.A., et al., *PGC-1alpha regulates a HIF2alpha-dependent switch in skeletal muscle fiber types*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(50): p. 21866-71.
213. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
214. Bonauer, A., et al., *MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice*. *Science*, 2009. **324**(5935): p. 1710-3.
215. Bonauer, A. and S. Dimmeler, *The microRNA-17-92 cluster: still a miRacle?* *Cell Cycle*, 2009. **8**(23): p. 3866-73.
216. Ghosh, G., et al., *Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(11): p. 4141-54.

217. Merlet, J., et al., *Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(11-12): p. 1924-38.
218. Mayr, M., D. Niederseer, and J. Niebauer, *From bench to bedside: what physicians need to know about endothelial progenitor cells*. Am J Med, 2011. **124**(6): p. 489-97.
219. Kalka, C., et al., *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3422-7.
220. Crosby, J.R., et al., *Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation*. Circ Res, 2000. **87**(9): p. 728-30.
221. van Royen, N., et al., *START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease*. Circulation, 2005. **112**(7): p. 1040-6.
222. Kawamoto, A., et al., *Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial*. Stem Cells, 2009. **27**(11): p. 2857-64.
223. Burt, R.K., et al., *Autologous peripheral blood CD133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia*. Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(1): p. 111-6.
224. Sieveking, D.P. and M.K. Ng, *Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench*. Vasc Med, 2009. **14**(2): p. 153-66.
225. Schatteman, G.C., M. Dunnwald, and C. Jiao, *Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(1): p. H1-18.
226. Tateishi-Yuyama, E., et al., *Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial*. Lancet, 2002. **360**(9331): p. 427-35.
227. Esato, K., et al., *Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease*. Cell Transplant, 2002. **11**(8): p. 747-52.
228. Walter, D.H., et al., *Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA)*. Circ Cardiovasc Interv, 2011. **4**(1): p. 26-37.

229. Powell, R.J., et al., *Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia*. J Vasc Surg, 2011. **54**(4): p. 1032-41.
230. Idei, N., et al., *Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: a comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and Buerger disease*. Circ Cardiovasc Interv, 2011. **4**(1): p. 15-25.
231. Grigoropoulos, N.F. and A. Mathur, *Stem cells in cardiac repair*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(2): p. 169-75.
232. Condorelli, G., et al., *Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10733-8.
233. Hassink, R.J., et al., *Morphology of atrial myocardium in human pulmonary veins: a postmortem analysis in patients with and without atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(6): p. 1108-14.
234. Gnecci, M., et al., *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*. Circ Res, 2008. **103**(11): p. 1204-19.
235. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-9.
236. Chamberlain, G., et al., *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2739-49.
237. Hare, J.M., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(24): p. 2277-86.
238. Lee, J.S., et al., *A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke*. Stem Cells, 2010. **28**(6): p. 1099-106.
239. Park, K.S., et al., *Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation*. Transplantation, 2010. **89**(5): p. 509-17.
240. Lazarus, H.M., et al., *Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells*

- (*mesenchymal progenitor cells*): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*, 1995. **16**(4): p. 557-64.
241. Horwitz, E.M., et al., *Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(13): p. 8932-7.
 242. Lasala, G.P., et al., *Combination stem cell therapy for the treatment of severe limb ischemia: safety and efficacy analysis*. *Angiology*, 2010. **61**(6): p. 551-6.
 243. Murohara, T., *Autologous adipose tissue as a new source of progenitor cells for therapeutic angiogenesis*. *J Cardiol*, 2009. **53**(2): p. 155-63.
 244. Miyazaki, T., et al., *Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potential of mesenchymal differentiation by ceiling culture of mature fat cells from subcutaneous adipose tissue*. *Differentiation*, 2005. **73**(2-3): p. 69-78.
 245. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Tissue Eng*, 2001. **7**(2): p. 211-28.
 246. Kondo, K., et al., *Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(1): p. 61-6.
 247. Sumi, M., et al., *Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis*. *Life Sci*, 2007. **80**(6): p. 559-65.
 248. Smith, R.R., et al., *Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens*. *Circulation*, 2007. **115**(7): p. 896-908.
 249. Zimmet, H. and H. Krum, *Using adult stem cells to treat heart failure--fact or fiction?* *Heart Lung Circ*, 2008. **17 Suppl 4**: p. S48-54.
 250. Traktuev, D.O., et al., *A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks*. *Circ Res*, 2008. **102**(1): p. 77-85.
 251. Nakagami, H., et al., *Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(12): p. 2542-7.

252. Kondo, T., et al., *Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1442-7.
253. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(7): p. 593-600.
254. Tateishi, K., et al., *Stemming heart failure with cardiac- or reprogrammed-stem cells*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(6A): p. 2217-32.
255. Adams, B., Q. Xiao, and Q. Xu, *Stem cell therapy for vascular disease*. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. **17**(7): p. 246-51.
256. Leeper, N.J., A.L. Hunter, and J.P. Cooke, *Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells*. *Circulation*, 2010. **122**(5): p. 517-26.
257. Huang, N.F., et al., *Embryonic stem cell-derived endothelial cells engraft into the ischemic hindlimb and restore perfusion*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(5): p. 984-91.
258. Blum, B. and N. Benvenisty, *The tumorigenicity of human embryonic stem cells*. *Adv Cancer Res*, 2008. **100**: p. 133-58.
259. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
260. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. *Science*, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
261. Park, I.H., et al., *Disease-specific induced pluripotent stem cells*. *Cell*, 2008. **134**(5): p. 877-86.
262. Mauritz, C., et al., *Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells*. *Circulation*, 2008. **118**(5): p. 507-17.
263. Narazaki, G., et al., *Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells*. *Circulation*, 2008. **118**(5): p. 498-506.
264. Suzuki, H., et al., *Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells*. *BMC Cell Biol*, 2010. **11**: p. 72.
265. Hershey, J.C., et al., *Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis*. *Cardiovasc Res*, 2001. **49**(3): p. 618-25.

266. Karnabatidis, D., et al., *Transauricular arterial or venous access for cardiovascular experimental protocols in animals*. J Vasc Interv Radiol, 2006. **17**(11 Pt 1): p. 1803-11.
267. Wintermark, M., et al., *Cerebral perfusion CT: technique and clinical applications*. J Neuroradiol, 2008. **35**(5): p. 253-60.
268. Kambadakone, A.R. and D.V. Sahani, *Body perfusion CT: technique, clinical applications, and advances*. Radiol Clin North Am, 2009. **47**(1): p. 161-78.
269. Park, C.M., et al., *FN13762 murine breast cancer: region-by-region correlation of first-pass perfusion CT indexes with histologic vascular parameters*. Radiology, 2009. **251**(3): p. 721-30.
270. Reiner, C.S., et al., *Computed tomography perfusion imaging of renal cell carcinoma: systematic comparison with histopathological angiogenic and prognostic markers*. Invest Radiol, 2013. **48**(4): p. 183-91.
271. Miles, K.A., *Measurement of tissue perfusion by dynamic computed tomography*. Br J Radiol, 1991. **64**(761): p. 409-12.
272. Blomley, M.J. and P. Dawson, *Bolus dynamics: theoretical and experimental aspects*. Br J Radiol, 1997. **70**(832): p. 351-9.
273. Lee, T.Y., T.G. Purdie, and E. Stewart, *CT imaging of angiogenesis*. Q J Nucl Med, 2003. **47**(3): p. 171-87.
274. Kagadis, G.C., et al., *Computerized analysis of digital subtraction angiography: a tool for quantitative in-vivo vascular imaging*. J Digit Imaging, 2008. **21**(4): p. 433-45.
275. Castenholz, A., *Interpretation of structural patterns appearing on corrosion casts of small blood and initial lymphatic vessels*. Scanning Microsc, 1989. **3**(1): p. 315-25.
276. Salis, M.B., et al., *Nerve growth factor supplementation reverses the impairment, induced by Type 1 diabetes, of hindlimb post-ischaemic recovery in mice*. Diabetologia, 2004. **47**(6): p. 1055-63.
277. Lee, T.H., et al., *Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1998. **29**(8): p. 1687-96; discussion 1697.
278. Lecht, S., et al., *Transient signaling of Erk1/2, Akt and PLCgamma induced by nerve growth factor in brain capillary endothelial cells*. Vascul Pharmacol, 2010. **53**(3-4): p. 107-14.
279. Lecht, S., et al., *Cardiac microvascular endothelial cells express and release nerve growth factor but not fibroblast growth factor-2*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. **46**(5): p. 469-76.

280. Ettinger, K., et al., *Nerve growth factor stimulation of ERK1/2 phosphorylation requires both p75NTR and alpha9beta1 integrin and confers myoprotection towards ischemia in C2C12 skeletal muscle cell model*. Cell Signal, 2012. **24**(12): p. 2378-88.
281. Schirmer, S.H. and N. van Royen, *Stimulation of collateral artery growth: a potential treatment for peripheral artery disease*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2004. **2**(4): p. 581-8.
282. Cao, Y., *Therapeutic angiogenesis for ischemic disorders: what is missing for clinical benefits?* Discov Med, 2010. **9**(46): p. 179-84.
283. Simons, M., et al., *Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary*. Circulation, 2000. **102**(11): p. E73-86.
284. Cao, Y., *Monotherapy versus combination therapy of angiogenic and arteriogenic factors for the treatment of ischemic disorders*. Curr Mol Med, 2009. **9**(8): p. 967-72.
285. Li, J., et al., *Synergistic effects of FGF-2 and PDGF-BB on angiogenesis and muscle regeneration in rabbit hindlimb ischemia model*. Microvasc Res, 2010. **80**(1): p. 10-7.
286. Lu, H., et al., *Combinatorial protein therapy of angiogenic and arteriogenic factors remarkably improves collateralogenesis and cardiac function in pigs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(29): p. 12140-5.
287. Zhang, J., et al., *Differential roles of PDGFR-alpha and PDGFR-beta in angiogenesis and vessel stability*. FASEB J, 2009. **23**(1): p. 153-63.
288. Richardson, T.P., et al., *Polymeric system for dual growth factor delivery*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(11): p. 1029-34.
289. Shyu, K.G., H. Chang, and J.M. Isner, *Synergistic effect of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor on neoangiogenesis in hypercholesterolemic rabbit model with acute hindlimb ischemia*. Life Sci, 2003. **73**(5): p. 563-79.
290. Ieda, Y., et al., *G-CSF and HGF: combination of vasculogenesis and angiogenesis synergistically improves recovery in murine hind limb ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(3): p. 540-8.
291. Chiaretti, A., et al., *Neuroprotective role of nerve growth factor in hypoxicischemic injury. From brain to skin*. Arch Ital Biol, 2011. **149**(2): p. 275-82.
292. Chiaretti, A., et al., *Improving ischaemic skin revascularisation by nerve growth factor in a child with crush syndrome*. Arch Dis Child, 2002. **87**(5): p. 446-8.

293. Kermani, P. and B. Hempstead, *Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis*. Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(4): p. 140-3.
294. Cristofaro, B., et al., *Neurotrophin-3 is a novel angiogenic factor capable of therapeutic neovascularization in a mouse model of limb ischemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(6): p. 1143-50.

Ε. Περίληψη

Η περιφερική αρτηριοπάθεια αποτελεί μία νόσο με αυξημένη επίπτωση στις σύγχρονες χώρες. Οι τρόποι αντιμετώπισής της ποικίλουν, ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με τις υπάρχουσες συμβατικές θεραπείες, είτε χειρουργικές, είτε συντηρητικές. Η αγγειογένεση αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο τρόπο αντιμετώπισης. Επιτελείται ευρεία έρευνα με χρησιμοποίηση μιας μεγάλης ποικιλίας ουσιών και κυττάρων με στόχο την επίτευξη θεραπευτικής αγγειογένεσης που θα βελτιώσει την κλινική εικόνα των ασθενών με περιφερική αρτηριοπάθεια. Ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) υπάρχουν αναφορές ότι έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική και παθολογική αγγειογένεση. Βασισμένοι σε αυτές τις παρατηρήσεις, υποθέσαμε ότι ο NGF μπορεί να επάγει το σχηματισμό λειτουργικών αιμοφόρων αγγείων σε μοντέλο ισχαιμίας οπισθίων άκρων κονίκλου. Η ισχαιμία στα οπίσθια άκρα προκλήθηκε σε 34 κονίκλους με αμφοτερόπλευρο εμβολισμό της μηριαίας αρτηρίας. Την 7^η, 14^η και 20^η ημέρα μετά τον εμβολισμό χορηγήθηκε NGF ενδομυϊκά σε ένα από τα δύο ισχαιμικά άκρα και εγχύθηκε μάρτυρας στο άλλο άκρο. Την 40^η ημέρα, τα νεοσχηματισμένα παράπλευρα αγγεία διαμέτρου μεγαλύτερης των 500μm ποσοτικοποιήθηκαν με διαωτιαία ενδοαρτηριακή αφαιρετική αγγειογραφία. Πραγματοποιήθηκε, επίσης, *in vivo* δυναμική αξονική τομογραφία αιμάτωσης σε αμφότερα τα άκρα ώστε να διερευνηθεί η αιμοδυναμική ανάρρωση των ισχαιμικών ιστών. Η λειτουργική εκτίμηση της αιμάτωσης των άκρων έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της αιματικής ροής και του όγκου αίματος στα άκρα που χορηγήθηκε NGF. Ωστόσο, η αύξηση των παράπλευρων αγγείων δεν ήταν ανιχνεύσιμη

αγγειογραφικά, κάτι που υποδηλώνει ότι ο NGF ενίσχυσε τη δημιουργία τριχοειδικού δικτύου αλλά όχι την αρτηριογένεση. Ο συνδυασμός του NGF είτε με αναστολέα του TrkA είτε με αναστολέα του VEGFR-2, κατήργησε την αιμοδυναμική ανάρρωση που προκάλεσε ο NGF. Αυτό δείχνει εξάρτηση της αγγειογενετικής δράσης του NGF τόσο από το δικό του υποδοχέα άμεσα, όσο και από τον υποδοχέα του VEGF έμμεσα. Τα ανωτέρω ευρήματα προσφέρουν νέους ορίζοντες στην κατανόηση της δράσης του NGF στο σχηματισμό νέων αγγείων και στις πιθανές εφαρμογές του στη θεραπευτική αγγειογένεση.

ΣΤ. Abstract

Nerve growth factor (NGF) has been reported to play an important role in physiological and pathological angiogenesis. Based on these observations, we hypothesized that NGF may induce the formation of functional blood vessels in a hindlimb ischemic rabbit model. Hindlimb ischemia was induced in 34 rabbits bilaterally by endovascular embolization of femoral arteries. On the 7th, 14th, and 20th postembolization days, NGF was injected intramuscularly, in 1 ischemic limb, and vehicle was injected in the contralateral control limb. On the 40th day, newly developed collateral vessels (diameter .500 mm) were quantified by transauricular intraarterial subtraction angiography. Perfusion analysis of an in vivo dynamic computed tomography study was performed to the limbs to investigate the hemodynamic recovery of the distal ischemic tissues. Functional estimation of limb perfusion showed a statistically significant increase of blood flow and blood volume for NGF. However, the increase of the collateral vessels was not detectable angiographically, providing evidence for the existence of a NGF-stimulated capillary angiogenic network but not increase of arteriogenesis. The combination of NGF with either tropomyosin-related kinase type A or vascular endothelial growth factor receptor 2 antagonists abolished the NGF-induced hemodynamic recovery. These findings provide new insights into understanding the involvement of NGF in vascular formation and its applications in therapeutic angiogenesis.

Z. Παρουσιάσεις σε συνέδρια

1. Πειραματική μελέτη της φυσιολογικής διαδικασίας επαναιμάτωσης σε ισχαιμία άκρων κονίκλων με τη χρήση του πρωτοκόλλου CT perfusion. Α. Καρατζας, Κ. Κατσάνος, Α. Διαμαντόπουλος, Σ. Σπηλιόπουλος, Γ. Καγκάδης, Δ. Καρναμπατίδης, Δ. Σιαμπλής. **18^ο Διαπανεπιστημιακό συνέδριο Ακτινολογίας**, 14-16 Νοεμβρίου 2008, Ιωάννινα
2. Quantitative computed tomography perfusion imaging of arteriogenesis in an endovascular model of rabbit hind limb ischemia. K. Katsanos, A. Karatzas, A. Dimantopoulos, S. Spiliopoulos, I. Paraskevopoulos, D. Karnabatidis, D. Siablis. **CIRSE 2009**, Lisbon, Portugal, 19-23 September 2009
3. Ποσοτικοποίηση των αιμοδυναμικών ιδιοτήτων της αρτηριογένεσης με υπολογιστική τομογραφία αιματώσεως (Perfusion CT) σε πειραματικό μοντέλο κόπωσης ισχαιμικών κάτω άκρων. Κατσάνος Κ., Καρατζάς Α., Διαμαντόπουλος Α., Σπηλιόπουλος Σ., Καρναμπατίδης Δ., Καλογεροπούλου Χ., Πέτσας Θ., Σιαμπλής Δ. **19^ο Διαπανεπιστημιακό συνέδριο Ακτινολογίας**, 12-15 Νοεμβρίου 2009, Θεσσαλονίκη.
4. Computed tomography perfusion imaging in an endovascular model of rabbit hindlimb ischemia: A functional quantification of arteriogenesis. A. Karatzas, K. Katsanos, A. Diamantopoulos, D. Karnabatidis, D. Siablis. **SIR 2010 35th Annual Scientific Meeting**, Tampa, USA, 13-18 March 2010
5. Εκτίμηση της επίδρασης του νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF) στην αγγειογένεση σε μοντέλο ισχαιμίας οπίσθιων άκρων

κονίκλων. Α. Καρατζάς, Κ. Κατσάνος, Α. Διαμαντόπουλος, Σ. Σπηλιόπουλος, Π. Κίτρου, Δ. Καρναμπατίδης. Δ. Σιαμπλής, Ρ. Lazarovici, Ν. Τσοπάνογλου. **15^ο Συνέδριο Ακτινολόγων Νοτιοδυτικής Ελλάδας**, Πυργος Ηλείας, 22-23 Ιουνίου 2012

Η. Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά με κριτές

NGF promotes hemodynamic recovery in a rabbit hindlimb ischemic model through trkA- and VEGFR2-dependent pathways. Karatzas A, Katsanos K, Lilis I, Papadaki H, Kitrou P, Lecht S, Marcinkiewicz C, Siablis D, Lelkes PI, Lazarovici P, Tsopanoglou NE. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013 Sep;62(3):270-7.