

«Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας»

«Πρόγραμμα Σπουδών: Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Διπλωματική Εργασία

«Βιοδείκτες νοσημάτων καρδιάς»

Βασιλική Α. Τσίγκου

Επιβλέπων Καθηγητής: Ανδρέας Σκορίλας

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας («Βασιλικής Α. Τσίγκου») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

«Βιοδείκτες Νοσημάτων Καρδιάς»

Βασιλική Α. Τσίγκου

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ανδρέας Σκορίλας

Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, ΕΚΠΑ
και ΣΘΕΤ, ΕΑΠ

Συνεπιβλέποντες Καθηγητές:

Αργυρώ Σγουρού

Επίκουρη Καθηγήτρια, ΣΘΕΤ, ΕΑΠ

Διαμαντής Σιδερός

Καθηγητής Βιοχημείας, ΣΘΕΤ, ΕΑΠ

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Ευχαριστίες

Στους καθηγητές μου, για την αμέριστη καθοδήγησή τους

Περίληψη

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα απασχολούν σημαντικό μέρος του πληθυσμού παγκοσμίως και σχετίζονται με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα παρά τις εξελίξεις στη διάγνωση και τη θεραπεία. Αποτελούνται από μια πλειάδα νοσολογικών καταστάσεων με πιο συχνές τη στεφανιαία νόσο, την καρδιακή ανεπάρκεια, την αρτηριακή υπέρταση, τη δυσλιπιδαιμία και τις αρρυθμίες. Οι εξελίξεις στην έρευνα και στις αναλυτικές εργαστηριακές μεθόδους έχουν δώσει τη δυνατότητα μέτρησης αρκετών βιοδεικτών που συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι βιοδείκτες μπορούν να διευκολύνουν τη διάγνωση των νοσημάτων, την πρόγνωση των ασθενών, την ανάδειξη των ατόμων σε κίνδυνο για νόσο και να καθοδηγήσουν τη θεραπεία. Οι βιοδείκτες μπορούν να είναι είτε κυκλοφορούντα μόρια, είτε μόρια που λαμβάνονται από απεικονιστικές εξετάσεις του καρδιαγγειακού συστήματος και συνεκτιμώμενα με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου αυξάνουν τις πληροφορίες που είναι απαραίτητες για τη διαχείριση των ασθενών. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η μελέτη των γενετικών δεικτών οι οποίοι συμμετέχουν επιπλέον στον καθορισμό της απάντησης στις χορηγούμενες θεραπείες. Οι βιοδείκτες είναι απαραίτητο να προσδιορίζονται με κατάλληλες αναλυτικές τεχνικές με την απαιτούμενη για κάθε νόσο ευαισθησία και ειδικότητα ώστε να μπορούν να διευκολύνουν τις ιατρικές αποφάσεις. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τους βιοδείκτες των συχνότερων νοσημάτων της καρδιάς. Αρχικά, θα γίνει περιγραφή της παθοφυσιολογίας των συχνότερων καρδιαγγειακών νόσων και θα περιγραφούν οι ιδιότητες ενός ιδανικού βιοδείκτη και τα ζητούμενα χαρακτηριστικά του. Έπειτα, θα παρουσιασθούν οι σημαντικότερες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των κυκλοφορούντων βιοδεικτών. Εν συνεχεία, θα παρουσιασθούν οι σημαντικότεροι κυκλοφορούντες βιοδείκτες με κλινική ένδειξη για την ανθρώπινη καρδιαγγειακή νόσο, ακολούθως δεδομένα σχετικά με τους βιοδείκτες με ερευνητικό κυρίως ενδιαφέρον και τέλος θα δοθούν πληροφορίες για τους γενετικούς βιοδείκτες του καρδιαγγειακού συστήματος.

Λέξεις – Κλειδιά

Βιοδείκτες, καρδιαγγειακά νοσήματα, εργαστηριακές μέθοδοι, παθοφυσιολογία

Abstract

Cardiovascular diseases affect a significant proportion of human population worldwide and are associated with increased morbidity and mortality despite the advances in diagnosis and treatment. Cardiovascular diseases are a wide spectrum of medical conditions although coronary heart disease, heart failure, arterial hypertension, dyslipidemia and arrhythmias are the most common presentations. Recent advances in the field of research and analytical laboratory methods have facilitated the assessment of several biomarkers involved in the pathophysiology of cardiovascular diseases. Biomarkers can supplement diagnosis, patient prognosis, identification of individuals at risk for disease and guide patient treatment. Biomarkers can be either circulating molecules or molecules obtained from imaging examinations of the cardiovascular system and along with classic risk factors could increase knowledge about patient management. Evaluation of genetic biomarkers is important and could also indicate the efficacy and response of the administered medical treatments. Biomarkers should be assessed with the aid of appropriate analytical techniques with the recommended sensitivity and specificity required in order to improve medical decisions. The purpose of this study was to perform a literature review about biomarkers of the most common heart diseases. First, we describe the pathophysiology of the most common cardiovascular diseases, the properties of an ideal biomarker and its desired characteristics. Then, the most important analytical methods used for the estimation of circulating biomarkers will be presented. Subsequently, we present circulating biomarkers which have been approved for human cardiovascular disease. Finally, information about circulating biomarkers with research interest as well as of genetic biomarkers will be described.

Keywords

Biomarkers, cardiovascular diseases, laboratory evaluation, pathophysiology

Περιεχόμενα

ΕΝΟΤΗΤΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Περίληψη	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	viii
Κατάλογος Πινάκων	ix
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια	x
1. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΣ	9
1.1 ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ	9
1.2 ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	12
1.3 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	14
1.4 ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ	16
1.5 ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ	18
1.6 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΕΜΒΟΛΗ	19
1.7 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ	20
1.8 ΒΑΛΒΙΔΟΠΑΘΕΙΕΣ	21
1.9 ΚΟΛΠΙΚΗ ΜΑΡΜΑΡΥΓΗ	22
1.10 ΚΑΡΔΙΟ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ	23
1.11 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ	24
2. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ: ΟΡΙΣΜΟΙ, ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ, ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ, ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ, ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΕΚΤΑΣΕΙΣ	25
3. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	31
4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	34
5. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	50
6. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	76
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	84
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Βιοδείκτες του καρδιαγγειακού συστήματος

Εικόνα 2: Χρωματομετρική αντίδραση Liebermann-Burchard για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης

Εικόνα 3: Ενζυμική αντίδραση Trinder για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα

Εικόνα 4: Τύποι ELISA (Άμεση, έμμεση, sandwich, ανταγωνιστική)

Εικόνα 5: Ραδιοανοσολογική μέθοδος

Εικόνα 6: Τεχνική Western blot

Εικόνα 7: Τεχνική Western blot

Εικόνα 8: Τυπικό χρωματογράφημα

Εικόνα 9: Απεικόνιση εφαρμοζόμενης μεθοδολογίας στη φασματομετρία μαζών

Εικόνα 10: Βήματα μεθοδολογίας PCR

Εικόνα 11: Καμπύλη αντίδρασης real-time PCR

Εικόνα 12: Μέθοδος αλληλούχησης κατά Sanger

Εικόνα 13: Παράδειγμα καμπύλης τήξης για τη μελέτη πολυμορφισμών DNA

Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής των μικροσυστοιχιών

Εικόνα 15: Περιγραφή των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των λιποπρωτεϊνών του ορού

Εικόνα 16: Κατηγοριοποίηση των λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών του ορού

Εικόνα 17: Γενετικοί βιοδείκτες καρδιαγγειακού συστήματος

Εικόνα 18: Non coding RNAs και καρδιαγγειακά νοσήματα

Εικόνα 19: Βιογένεση των κυκλοφορούντων microRNA

Εικόνα 20: Παραδείγματα ncRNA που σχετίζονται με καρδιαγγειακά νοσήματα

Εικόνα 21: Συμμετοχή των long non coding RNA στις παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Βιοδείκτες καρδιαγγειακού συστήματος που βρίσκονται σε ερευνητικό επίπεδο

Πίνακας 2: Γενετικοί πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις που σχετίζονται με νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος

Πίνακας 3: Φαρμακογονιδιωματική και καρδιαγγειακό σύστημα

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

American Heart Association/American College of Cardiology	AHA/ACC
ATP-binding cassette transporter 1	ABCA1
Λόγος αλβουμίνης-κρεατινίνης ούρων (Albumin to creatinine ratio)	ACR
A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin-like motifs 7	ADAMTS7
Asymmetric dimethyl-L-arginine	ADMA
Κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο	ANP
Απολιποπορωτεΐνη Β	apoB
Apolipoprotein E	APOE
Αντιδιουρητική ορμόνη	AVP
Εγκεφαλικό νατριουρητικό πεπτίδιο	BNP
Κυκλικό GMP	cGMP
Κυκλικά RNA	circRNAs
Κρεατινική κινάση, Καρδιακό Ισοένζυμο	CK-MB
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη	CRP
Πρωτεΐνη 4 που σχετίζεται με τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα	CTLA-4
Κυτόχρωμα P450	CYP
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
Ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου	eNOS
Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα	EPCs
Ευρωπαϊκή Καρδιολογική Εταιρεία	ESC
Food and Drug Administration	FDA
Αέρια χρωματογραφία	GC
Growth differentiation factor-15	GDF-15
Glutathione peroxidase 4	GPX4
Υποδοχέας του ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα-2	HER2
Καρδιακή ανεπάρκεια με ήπια μειωμένο κλάσμα εξώθησης	HFmrEF
Καρδιακή ανεπάρκεια με διατηρημένο κλάσμα εξώθησης	HFpEF
Καρδιακή ανεπάρκεια με μειωμένο κλάσμα εξώθησης	HFfrEF
Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A	HMG-CoA
Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης	HPLC
Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1	ICAM-1
Λιποπρωτεΐνη ενδιάμεσης πυκνότητας	IDL
Ιντερφερόνη γ	IFN-γ
Ιντερλευκίνη	IL
Επαγόμενη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου	iNOS
Υγρή χρωματογραφία	LC
Γαλακτική αφυδρογονάση	LDH
Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας	LDL
Υποδοχέας της LDL	LDLR
Λιποπρωτεΐνη α	Lpa
Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A ₂	Lp-PLA ₂
Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μακροφάγων	MCP-1
microRNA	miR
Μεταλλοπρωτεάσες	MMPs

Microparticles	MP
Μυελουπεροξειδάση	MPO
Φασματομετρία μάζας	MS
Myosin-Binding Protein C 3	MYBPC3
B-Myosin Heavy Chain 7	MYH7
Noncoding RNAs	ncRNA
Πυρηνικός παράγοντας κάππα Β	NF-κΒ
Νευρωνική συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου	nNOS
Μονοξείδιο του αζώτου	NO
Οξέα στεφανιαία σύνδρομα χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (non ST segment elevation acute coronary syndromes)	NSTE-ACS
Έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (non-ST segment elevation myocardial infarction)	NSTEMI
Αμινοτελικό άκρο του προπεπτιδίου του εγκεφαλικού νατριουρητικού πεπτιδίου	NT-proBNP
Plasminogen activator inhibitor -1	PAI-1
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction)	PCR
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	PCSK9
Πρωτεΐνη κυτταρικού θανάτου-1	PD-1
Carboxy-terminal propeptide of procollagen type I	PICP
Amino-terminal propeptide of procollagen type III	PIIINP
Piwi-interacting RNA	piRNA
Άξονας ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης	RAAS
Radioimmunoassay	RIA
Receiver-operating characteristic curve	ROC
Αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου	ROS
Οξαλοξική Τρανσαμινάση	SGOT (ή AST)
Πυροσταφυλική Τρανσαμινάση	SGPT (ή ALT)
Small interfering RNA	siRNA
Small nucleolar RNAs	snoRNAs
Πολυμορφισμοί μονήρους νουκλεοτιδίου	SNPs
Small nuclear RNAs	snRNAs
Soluble suppression of tumorigenicity 2	sST2
Διαμεμβρανικός συνδέτης του ST2 (suppression of tumorigenicity 2)	ST2L
Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του διαστήματος ST (ST-segment elevation myocardial infarction)	STEMI
Tissue factor (ιστικός παράγοντας)	TF
Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας των όγκων β	TGF-β
Ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών	TIMPs
Toll-like receptors	TLRs
Παράγοντας νέκρωσης των όγκων αλφα	TNF-α
Αγγειακό μόριο προσκόλλησης-1	VCAM-1
Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας	VEGF
Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας	VLDL
Παράγοντας von Willebrand	vWF
Ενδοθηλίνη-1	ET-1

1. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΣ

1.1 ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί την πιο συχνή αιτία θνητότητας και νοσηρότητας παγκοσμίως και, σύμφωνα με πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα, η συχνότητα εμφάνισής της αυξάνεται σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος εν αντιθέσει με τις χώρες υψηλού εισοδήματος, σε μεγάλο βαθμό λόγω των εξελίξεων στην επεμβατική θεραπεία της στεφανιαίας νόσου, τη χρήση καρδιακών συσκευών και στην πρόοδο των χειρουργικών επεμβάσεων [1]. Παρόλα αυτά, η θνητότητα λόγω της στεφανιαίας νόσου παραμένει υψηλή και υπολογίζεται ότι αφορά το 38% των θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα για τις γυναίκες και το 44% των θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα για τους άνδρες [1]. Κλινικά, η στεφανιαία νόσος κατηγοριοποιείται σε δύο μείζονες εκδηλώσεις: τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα και τα χρόνια στεφανιαία σύνδρομα, ενώ καθεμία από αυτές τις κατηγορίες αποτελείται από μια ευρεία σειρά υποκατηγοριών (που θα περιγραφούν συνοπτικά παρακάτω), σύμφωνα με τις αναθεωρημένες κατευθυντήριες οδηγίες των καρδιολογικών εταιρειών [2, 3]. Το παθοφυσιολογικό υπόστρωμα της στεφανιαίας νόσου είναι η ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας εντός των στεφανιαίων αγγείων με σύνθετους μηχανισμούς (αθηρωμάτωση), υπό τη δράση των καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου είτε με την μορφή της αποφρακτικής αθηρωματικής πλάκας ή της μη-αποφρακτικής αθηρωματικής πλάκας [4].

Αναλυτικότερα, τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα είναι ένα φάσμα κλινικών εκδηλώσεων με διαφορετική πρόγνωση και κατηγοριοποιούνται στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του διαστήματος ST (ST-segment elevation myocardial infarction, STEMI) και στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (non-ST segment elevation acute coronary syndromes, NSTEMI), που περαιτέρω χωρίζονται στο έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (non-ST elevation myocardial infarction, NSTEMI) και την ασταθή στηθάγχη [2]. Η διάγνωση και η διαφορική διάγνωση των προαναφερθέντων στηρίζεται στην παρουσία συμπτωμάτων και σημείων καρδιαγγειακής νόσου, ηλεκτροκαρδιογραφικών αλλοιώσεων και στη μέτρηση των επιπέδων και των μεταβολών της τροπονίνης ορού [4]. Στην αποσαφήνιση των ανωτέρω έχει οδηγήσει ο νέος παγκόσμιος ορισμός για το έμφραγμα του μυοκαρδίου (fourth universal definition of myocardial infarction) [5]. Τα χρόνια στεφανιαία σύνδρομα είναι μια σύνθετη κλινική ομάδα που έχει αντικαταστήσει τον παλαιότερο όρο «σταθερή στεφανιαία νόσος» και αποτελείται από τις εξής μορφές: τους ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (<12 μήνες ή >12 μήνες) που είναι σταθεροποιημένοι κλινικά-ανεξάρτητα από την παρουσία συμπτωμάτων- ή με πρόσφατη αγγειοπλαστική, τους ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση καρδιακής ανεπάρκειας ή δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, τους ασθενείς με συμπτωματολογία σταθερής στηθάγχης και/ή δύσπνοια, με συμπτωματολογία στηθάγχης και/ή υποψία μικροαγγειακής ή αγγειοσυσπαστικής νόσου ή τους ασυμπτωματικούς ασθενείς που η διάγνωση της στεφανιαίας γίνεται σε τυχαίο έλεγχο [3].

Φυσιολογικά τα αγγεία επενδύονται από μια στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που δεν αποτελούν απλώς ένα μηχανικό φραγμό μεταξύ της αιματικής ροής και του αγγειακού τοιχώματος, αλλά επίσης ένα ενδοκρινικό όργανο με μια σειρά δράσεων σε παρακρινές και συστηματικό επίπεδο [6]. Κύριος μεσολαβητής της φυσιολογικής ενδοθηλιακής λειτουργίας είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), που παράγεται από το ένζυμο ενδοθηλιακή συνθετάση (eNOS) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, διαχέεται στις παρακείμενες

λείες μυικές ίνες και ευοδώνει την αγγειοδιαστολή έναντι της αγγειοσύσπασης, ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ασκεί αντιθρομβωτικές δράσεις, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές δράσεις και ρυθμίζει την αγγειακή ροή [7]. Η αθηρωμάτωση είναι μια χρόνια διαδικασία που ξεκινά από την παιδική ηλικία και επιδεινώνεται με τη γήρανση και τη δράση των παραγόντων κινδύνου (κάπνισμα, αρτηριακή υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, σακχαρώδης διαβήτης, μεταβολικό σύνδρομο, δράση μικροβιακών και περιβαλλοντικών τοξινών, δράσεις ορμονών όπως τα οιστρογόνα και αιμοδυναμικών διαταραχών) και σε συνδυασμό με το μοναδικό γενετικό υπόβαθρο κάθε ατόμου ευνοείται η εμφάνιση της ενδοθηλιακής βλάβης/δυσλειτουργίας που ωστόσο μπορεί να επηρεασθεί από τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής και θεραπείας [8, 9]. Στα πλαίσια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας συμβαίνει βλάβη και ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με συνέπεια τη μειωμένη παραγωγή NO και την έκφραση βιομορίων που ασκούν αντίθετες δράσεις όπως η ενδοθελίνη-1 (ET-1) και η θρομβοξάνη A2 (που ευνοούν την αγγειοσύσπαση) αλλά και παραγωγή NO από τα ένζυμα επαγόμενη ενδοθηλιακή συνθετάση (iNOS) και τη νευρωνική συνθετάση (nNOS) (που έχουν αντίθετες δράσεις από την eNOS). Μάλιστα, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί χαρακτηριστικό που εντοπίζεται σε μια σειρά αγγειακών δικτύων πέραν των στεφανιαίων αγγείων, όπως τα περιφερικά αγγεία αλλά και στη μικροκυκλοφορία [8]. Τέλος, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία έχει προγνωστική αξία για δυσμενή καρδιαγγειακά συμβάματα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και μπορεί να αναδείξει τους ασθενείς σε κίνδυνο [8].

Στα πλαίσια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας τα μόρια της LDL χοληστερόλης εισέρχονται στον υπενδοθηλιακό χώρο (σε θέσεις που ευνοούν την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών, όπου χαρακτηρίζονται από παθολογική διατμητική τάση-shear stress) και οξειδώνονται λόγω του οξειδωτικού στρες, της μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας του NO και της αυξημένης παραγωγής αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) με αποτέλεσμα τη δημιουργία της πρωταρχικής βλάβης εντός του αγγειακού τοιχώματος (λιπώδεις γραμμώσεις, fatty streaks) [10]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι παραπάνω δράσεις πυροδοτούνται από αλλαγές στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση των ενδοθηλιακών κυττάρων λόγω επιδράσεων στους μηχανοποδοχείς της επιφανείας τους κατόπιν της μειωμένης διατμητικής τάσης και των διαταραχών της αιματικής ροής [11, 12]. Στη συνέχεια, προσελκύνονται στο αγγειακό τοίχωμα μακροφάγα, τα οποία φαγοκυτταρώνουν τα οξειδωμένα μόρια της LDL και κυτταρικά θραύσματα και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα ("foam cells") [13]. Παράλληλα, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα στα πλαίσια του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής απελευθερώνουν μεσολαβητές όπως οι κυτταροκίνες και τα μόρια προσκόλλησης με συνέπεια την ενεργοποίηση των λείων μυικών ινών και τη μετατροπή τους σε έναν εκκριτικό φαινότυπο με αποτέλεσμα την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τη δημιουργία της ινώδους κάψας που επικαλύπτει την αθηρωματική βλάβη [10]. Κυρίαρχη θέση στις παραπάνω παθοφυσιολογικές διαδικασίες έχει η ενεργοποίηση του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (πυρηνικός παράγοντας κάππα Β) σε αγγειακές θέσεις με χαμηλή ενδοθηλιακή διατμητική τάση, που ρυθμίζει στην συνέχεια αρκετά κυτταρικά μονοπάτια εμπλεκόμενα με τη φλεγμονή και με επιγενετικές ρυθμίσεις μέσω αλλαγών στη δομή της χρωματίνης [14, 15]. Στα σημαντικότερα μόρια προσκόλλησης που συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης ανήκουν οι σελεκτίνες (πχ. E-selectin), το αγγειακό και διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης (VCAM-1, ICAM-1), οι ιντερλευκίνες (πχ. IL-1), η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μακροφάγων-1 (MCP-1) [16, 17].

Προϊόντος του χρόνου, η αθηρωματική πλάκα αυξάνεται σε μέγεθος καθώς συναθροίζονται εντός του λιπώδους πυρήνα εστέρες χοληστερόλης, οξειδωμένα μόρια LDL και κυτταρικά θραύσματα λόγω του φαύλου κύκλου της φλεγμονής και του οξειδωτικού

στρες αλλά και της χαμηλής διατμητικής τάσης [10]. Η ινώδης κάψα υφίσταται αναδιαμόρφωση ποικίλλου βαθμού λόγω της διήθησης από φλεγμονώδη κύτταρα (όπως τα Τ-λεμφοκύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς, δένδριτικά κύτταρα και ενεργοποιημένα μακροφάγα), τα οποία έχουν τη δυνατότητα αποδόμησής της μέσω αύξησης της απελευθέρωσης πρωτεολυτικών ενζύμων όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) αντί των ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών (TIMPs), που πυροδοτούνται από τη δράση προφλεγμονοδών μορίων όπως η ιντερφερόνη γ (IFN-γ) [18]. Παρόλα αυτά, δεν έχουν όλες οι αθηρωματικές πλάκες την ίδια εξέλιξη διαχρονικά για κάθε άτομο, ούτε επίσης οι αθηρωματικές πλάκες που βρίσκονται σε διαφορετικές αγγειακές θέσεις έχουν την ίδια εξέλιξη στο ίδιο άτομο αλλά και μεταξύ των ατόμων, και συγκεκριμένα, άλλες αθηρωματικές πλάκες παραμένουν σταθερές χωρίς να αυξάνονται σε μέγεθος, ενώ άλλες αναπτύσσουν το φαινότυπο της «ευάλωτης» αθηρωματικής πλάκας και είναι επιρρεπείς σε ρήξη ή διάβρωση και τη δημιουργία θρόμβου υποδηλώνοντας ότι η αθηρωμάτωση είναι ένα δυναμικό φαινόμενο [19].

Συγκεκριμένα, απεικονιστικές μελέτες έχουν δείξει ότι η «ευάλωτη» αθηρωματική πλάκα έχει μια σειρά μορφολογικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών όπως η παρουσία χαμηλής διατμητικής τάσης, η παρουσία ενός μικροπεριβάλλοντος φλεγμονής και διήθησης από μακροφάγα, η διάσπαση του έσω ελαστικού χιτώνα, ο αυξημένος λιπώδης πυρήνας, η παρουσία λεπτής ινώδους κάψας, ο μικρός αυλός, η παρουσία αιμορραγίας εντός της αθηρωματικής πλάκας και η θετική αναδιαμόρφωση του αγγειακού τοιχώματος [20, 21]. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, πέραν των ανατομικών χαρακτηριστικών, η παρουσία χαμηλής διατμητικής τάσης είναι αυτή που σχετίζεται με την έναρξη της αθηρωματικής πλάκας και που επιδεινώνει την αύξησή της υποδηλώνοντας τη σημασία της εκτίμησης λειτουργικών και μορφολογικών παραμέτρων για την πρόβλεψη της εξέλιξης της αθηρωμάτωσης, η οποία μπορεί να διευκολύνει την εκτίμηση του κινδύνου των ασθενών για μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα [20].

Το παθοφυσιολογικό υπόστρωμα των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων είναι σύνθετο και εκδηλώνεται με διαφορετικές παθολογοανατομικές μορφές όπως η ρήξη της ευάλωτης αθηρωματικής πλάκας, η διάβρωση της αθηρωματικής πλάκας, η παρουσία αποτιτανωμένων οζιδίων εντός της αθηρωματικής πλάκας, ο διαχωρισμός των στεφανιαίων αγγείων και ο σπασμός των στεφανιαίων αγγείων [22, 23]. Συγκεκριμένα, κατά τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας λόγω της παρουσίας φλεγμονής και της αυξημένης μηχανικής τάσης, εκτίθενται τα συστατικά της πλάκας εντός του αυλού τα οποία έχουν θρομβογόνο δράση με συνέπεια την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και ακολούθως του καταρράκτη της πήξης με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ινικής, που προκαλεί απόφραξη του αυλού και επιδεινώνει τη μυοκαρδιακή ισχαιμία [22]. Κυρίαρχα μόρια στην παραπάνω διαδικασία είναι η ενεργοποίηση του παράγοντα von Willebrand (vWF), η παραγωγή κολλαγόνου και η ενεργοποίηση του ιστικού παράγοντα [24]. Οι προκαλούμενες κλινικές εκδηλώσεις ανάλογα με το βαθμό της μυοκαρδιακής νέκρωσης μπορούν να αφορούν όλο το φάσμα των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων από την ασταθή στηθάγχη έως το STEMI [22]. Από την άλλη, η διάβρωση της αθηρωματικής πλάκας αφορά τη δημιουργία αιμοπεταλιακού θρόμβου πάνω σε μια σχετικά άθικτη ινώδη κάψα και χαρακτηρίζεται από μικρότερου βαθμού φλεγμονή ενώ συχνά συμβαίνει σε νεότερους ασθενείς με συχνότερη κλινική εκδήλωση το NSTEMI [25, 26]. Πέρα από τη συμμετοχή της αυξημένης διατμητικής τάσης, είναι σημαντικός για την παθοφυσιολογία της διάβρωσης της αθηρωματικής πλάκας ο ρόλος των εξωκυττάρων αθροίσεων ουδετεροφίλων που μπορούν και προσελκύουν τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια ευοδώνοντας τη δημιουργία του θρόμβου σε περιοχές διάβρωσης του ενδοθηλίου [27]. Ορισμένες περιοχές εντός των αθηρωματικών πλακών χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυξημένης εναπόθεσης κρυστάλλων ασβεστίου και δημιουργίας οζιδίων που οδηγούν σε στένωση του αυλού και προς τα έσω αναδιαμόρφωση

του αγγειακού τοιχώματος αλλά και με την πυροδότηση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων λόγω ρήξης των ασβεστοποιών οζιδίων, ενεργοποίησης των μηχανισμών της φλεγμονής, με συνέπεια τη δημιουργία θρόμβου πάνω σε μια διεσπασμένη κάψα [22, 28]. Μάλιστα, αυτές οι βλάβες σχετίζονται με την επαναστένωση εντός του στεντ και με υποτροπή μετά την εκδήλωση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου λόγω της αύξησης των διαστάσεων της αποτιτανωμένης μάζας εντός του αγγειακού αυλού παρά τη θεραπεία [29]. Από την άλλη, ο αυτόματος διαχωρισμός των στεφανιαίων αγγείων αποτελεί την πρόκληση μιας βλάβης-σχισμής ανάμεσα στον έσω-μέσο χιτώνα ή ανάμεσα στο μέσο-έξω χιτώνα που προκαλεί έναν ψευδοαυλό στο αγγειακό τοίχωμα, ο οποίος αποφράσσει την αιματική ροή λόγω της δημιουργίας ενδοτοιχωματικού αιματώματος, με επακόλουθο την ισχαιμία στην περιοχή μετά το διαχωρισμό και την εκδήλωση συμπτωματολογίας οξέος στεφανιαίου συνδρόμου [30]. Τέλος, όσον αφορά το σπασμό των στεφανιαίων αγγείων, έχει διατυπωθεί ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία της μικροκυκλοφορίας ή των επικαρδιακών στεφανιαίων αγγείων και η συνακόλουθη αύξηση του αγγειακού τόνου είναι υπεύθυνη ως μηχανισμός πρόκλησης των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων και πολλές φορές σχετίζεται με την απουσία «υποπτων» αγγειακών βλαβών στη στεφανιογραφία [31].

Από την άλλη πλευρά, οι «σταθερές» αθηρωματικές πλάκες αναπτύσσουν μια αυξημένου πάχους ινώδη κάψα, που περικλύει έναν λιπώδη πυρήνα μικρού μεγέθους με λιγότερα φλεγμονώδη στοιχεία, και προοδευτικά αυξάνεται σε μέγεθος αποκτώντας ένα προφίλ αναδιαμόρφωσης του τοιχώματος προς τα έσω, που σχετίζεται με την παρουσία αυξημένης διατμητικής τάσης [20]. Μάλιστα, η προς τα έσω αναδιαμόρφωση μπορεί να μην οφείλεται τόσο στην παρουσία αυξημένης διατμητικής τάσης αλλά στην απουσία της προαθηρογόνου, χαμηλής διατμητικής τάσης και της φλεγμονής, και μπορεί να αναπτυχθεί είτε με τον καιρό σε μια αθηρωματική πλάκα είτε ήδη από τα αρχικά στάδια μιας αθηρωματικής πλακάς [20]. Η παρουσία αυτών των μορφολογικών χαρακτηριστικών συνήθως παρατηρείται στα χρόνια στεφανιαία σύνδρομα [32]. Η αύξηση του μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας προκαλεί προοδευτικά συμπτώματα ισχαιμίας όταν υπάρχει αναντιστοιχία ανάμεσα στις ανάγκες σε οξυγόνο από το μυοκάρδιο και το παρεχόμενο οξυγόνο από την αιματική ροή, όπως για παράδειγμα συμβαίνει όταν υπάρχει αύξηση του μεταφορτίου της αριστερής κοιλίας (πχ. αρτηριακή σκληρία), αύξηση του προφορτίου, της καρδιακής συχνότητας ή της συσπαστικότητας του μυοκαρδίου ώστε να καλυφθούν οι μεταβολικές ανάγκες του σώματος [33]. Τέλος, τα παροδικά επεισόδια μυοκαρδιακής ισχαιμίας σχετίζονται με την πρόκληση του απόπληκτου μυοκαρδίου (το οποίο έχει μια αναστρέψιμη διαταραχή της συσπαστικότητας, η οποία αποκαθίσταται μερικώς μετά την επαναιμάτωση), αλλά και με την «προστασία» του μυοκαρδίου από επεισόδια περαιτέρω μείωσης της αιματικής ροής (ischemic preconditioning) [34]. Παρόλα αυτά, η παρατεταμένη ισχαιμία μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση μη-αναστρέψιμων μορφολογικών βλαβών των μυοκαρδιακών κυττάρων, στην απόπτωσή τους, στην εμφάνιση ινωτικών βλαβών στο μυοκάρδιο (αναδιαμόρφωση) και στη μειωμένη συστολική εφεδρεία του μυοκαρδίου («χειμάζων μυοκάρδιο») [35].

1.2 ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι ένα σύνθετο κλινικό σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται από μια σειρά σημείων και συμπτωμάτων που οφείλονται στην πρόκληση δομικής και/ή λειτουργικής διαταραχής στο μυοκάρδιο, με συνέπεια την ανεπαρκή καρδιακή παροχή ή αυξημένες πιέσεις πλήρωσης στην ηρεμία ή την κόπωση [36]. Για την κατηγοριοποίηση της καρδιακής ανεπάρκειας έχουν προταθεί πολλοί ορισμοί και ταξινομήσεις: οξεία ή

χρόνια, συστολική ή διαστολική, αριστερή ή δεξιά, ισχαιμική και μη-ισχαιμική [36-38]. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, η καρδιακή ανεπάρκεια ταξινομείται ως προς το κλάσμα εξώθησης σε καρδιακή ανεπάρκεια με μειωμένο ($\leq 40\%$, HFrEF), ήπια μειωμένο ($41-49\%$, HFmrEF) και διατηρημένο (≥ 50 , HFpEF) κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας, ενώ στην επιμέρους κατηγοριοποίηση αξιολογούνται η παρουσία σημείων/συμπτωμάτων, δομικές και λειτουργικές διαταραχές του μυοκαρδίου και οι τιμές των νατριουρητικών πεπτιδίων [36]. Οι αιτιολογικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τη στεφανιαία νόσο, την αρτηριακή υπέρταση, τις βαλβιδοπάθειες, τις αρρυθμίες, λοιμώδη αίτια, τις διάφορες μυοκαρδιοπάθειες, τις συγγενείς καρδιοπαθείες, αλλά και σπανιότερα αίτια όπως μεταβολικά νοσήματα, φαρκευτικά-επαγόμενη μυοκαρδιακή καρδιοτοξικότητα, νευρομυικά νοσήματα, δηλητηρικά νοσήματα, που μπορεί να επηρεάζουν το μυοκάρδιο, το περικάρδιο και τις βαλβίδες της καρδιάς [36]. Οι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια έχουν πτωχή επιβίωση και ποιότητα ζωής, συχνές επανανοσηλίες, ως εκ τούτου υπάρχει ανάγκη για έγκαιρη διάγνωση και λήψη θεραπευτικής αγωγής λαμβάνοντας υπόψη την υποκείμενη αιτιολογία που οδήγησε στη μυοκαρδιακή διαταραχή [36].

Η παθοφυσιολογία της καρδιακής ανεπάρκειας είναι σύνθετη και αφορά την ενεργοποίηση κυτταρικών μηχανισμών σε μια προσπάθεια για αντιρρόπηση της καρδιακής λειτουργίας μετά από την πρόκληση δομικής ή λειτουργικής μυοκαρδιακής βλάβης [39]. Όσον αφορά την οξεία καρδιακή ανεπάρκεια, αυτή μπορεί να πρόκειται για την απορρύθμιση της μυοκαρδιακής λειτουργίας επί εδάφους χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, είτε να αφορά την εκδήλωση μυοκαρδιακής δυσλειτουργίας για πρώτη φορά με συνέπεια την ποικίλου βαθμού απορρύθμιση της συστολικής, διαστολικής καρδιακής λειτουργίας, είτε της αριστερής είτε της δεξιάς κοιλίας, την αρτηριακή και φλεβική συμφόρηση, στην οποία συμμετέχουν η ενεργοποίηση των νευροορμονικών μηχανισμών (ενεργοποίηση του άξονα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, RAAS, του συμπαθητικού συστήματος και η απελευθέρωση της αντιδιουρητικής ορμόνης), της φλεγμονής (με απελευθέρωση μιας σειράς κυτταροκινών όπως οι IL-6, CRP), του οξειδωτικού στρες, της πηκτικότητας αλλά και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [40-45]. Ακόμη, ένα κυρίαρχο χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας λόγω των αυξημένων πιέσεων πλήρωσης και της διάτασης των μυοκαρδιακών κοιλοτήτων είναι η απελευθέρωση των νατριουρητικών πεπτιδίων (B-type natriuretic peptide, BNP και N-terminal proBNP, NT-proBNP) [46]. Μάλιστα, η ενεργοποίηση των νευροορμονικών μηχανισμών σχετίζεται με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας και της λειτουργίας οργάνων όπως το ήπαρ, το έντερο, οι πνεύμονες, που δυσχαιρένει την πρόγνωση των ασθενών [45, 47].

Η HFrEF χαρακτηρίζεται από τη συστολική δυσλειτουργία του μυοκαρδίου και (συχνά) από την παρουσία αυξημένων πιέσεων πλήρωσης της αριστερής κοιλίας που σχετίζονται κλινικά με την εκδήλωση πνευμονικής συμφόρησης ενώ συχνά ακολουθεί η επιδείνωση της λειτουργίας της δεξιάς καρδιάς [48]. Υποκείμενο αίτιο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αποτελεί η επίδραση ενός παράγοντα στο μυοκάρδιο που οδηγεί σε απώλεια μυοκαρδιακών κυττάρων είτε άμεσα (όπως κατά το έμφραγμα του μυοκαρδίου) είτε χρονίως (όπως σε περιπτώσεις χρόνιας αιμοδυναμικής επιβάρυνσης όπως στις βαλβιδοπάθειες, ή στις μυοκαρδιοπάθειες, όπου γενετικές βλάβες επιδεινώνουν τη συσπαστικότητα του μυοκαρδίου και οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο) [49]. Η απώλεια των μυοκαρδιακών ινών και η επακόλουθη διαταραχή της συσπαστικότητας οδηγεί σε χαμηλότερο δραστικό αρτηριακό όγκο αίματος που γίνεται αντιληπτός από τους τασεουποδοχείς της περιφέρειας με αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης του συμπαθητικού συστήματος (θετική ινότροπη και χρονότροπη δράση λόγω της απελευθέρωσης νορεπινεφρίνης) και την αναστολή της δράσης του παρασυμπαθητικού συστήματος με συνέπεια την πρόκληση βλάβης σε όργανα-στόχους (καρδιά, νεφροί, περιφερικά αγγεία) [49]. Λόγω της αγγειοσύσπασης συμβαίνει κατακράτηση ύδατος και άλατος από το νεφρό και απελευθερώνεται η ορμόνη ρενίνη [50].

Παράλληλα, ένα ακόμη στοιχείο της παθοφυσιολογίας είναι η ενεργοποίηση του άξονα RAAS και η επακόλουθη παραγωγή αγγειοτενσίνης II (με τη βοήθεια του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης), η οποία ασκεί αγγειοσυσπαστική και μιτογόνο δράση και ευοδώνει την απελευθέρωση αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια με τελικό αποτέλεσμα την κατακράτηση ύδατος και άλατος από τον νεφρό και την πρόκληση οιδήματος [51]. Ταυτόχρονα, η αγγειοτενσίνη II συμμετέχει στην έκλυση της αντιδιουρητικής ορμόνης (AVP, arginine vasopressin) που συνεισφέρει σε περαιτέρω κατακράτηση ύδατος με συνέπεια την εμφάνιση υπονατριαιμίας, που αποτελεί κακό προγνωστικό σημείο στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια [51]. Σε μια προσπάθεια αντιστάθμισης της υπερφόρτωσης ύδατος και άλατος, απελευθερώνονται τα νατριουρητικά πεπτίδια από τις μυοκαρδιακές κοιλότητες στα πλαίσια της υπερδιάτασής τους, που φυσιολογικά αντισταθμίζουν την ενεργοποίηση των νευροορμονικών μηχανισμών, ωστόσο, στα τελικά στάδια του συνδρόμου είναι ανεπαρκείς ως μηχανισμός ελέγχου με συνέπεια την αντίσταση στη δράσή τους [52]. Τέλος, στην παθοφυσιολογία της HFrEF συμμετέχουν η αύξηση των περιφερικών αγγειακών αντιστάσεων που αυξάνει το μεταφορτίο της αριστερής κοιλίας, η αύξηση των πιέσεων πλήρωσης της αριστερής κοιλίας, οι αλλαγές στο μηχανισμό σύζευξης ηλεκτρικής διέγερσης-μηχανικής συστολής του μυοκαρδίου λόγω διαταραχών στο ενδοκυττάριο ασβέστιο και η διαταραχή της μυοκαρδιακής παραγωγής ενέργειας από τα μιτοχόνδρια [53, 54]. Όλοι οι προηγούμενοι μηχανισμοί ευοδώνουν την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και την εκδήλωση των δομικών και λειτουργικών διαταραχών που εκδηλώνονται στην HFrEF [55].

Από την άλλη, όσον αφορά την HFpEF, λόγω της παρουσίας συννοσηροτήτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, η αρτηριακή υπέρταση και η χρόνια αποφρακτική ανεπάρκεια, εκδηλώνονται αυξημένες πιέσεις πλήρωσης λόγω της υπερτροφίας και της ίνωσης του μυοκαρδίου [56]. Στην HFpEF έχει περιγραφεί ένα μικροπεριβάλλον φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας που περιλαμβάνει τη στεφανιαία μικροκυκλοφορία και που συμμετέχει στην ανάπτυξη σκληρίας των μυοκαρδιακών ινών, στην εμφάνιση διάμεσης ίνωσης με συνέπεια την αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου (συγκεντρική υπέρτροφία) και την πρόκληση αρτηριακής σκληρίας με συνέπεια την αύξηση του μεταφορτίου της αριστερής κοιλίας [56]. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της HFpEF έχει η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που συντελεί στη διαταραχή της παραγωγής ενέργειας στο μυοκάρδιο [57].

Τέλος, όσον αφορά τη HFmrEF, αποτελεί έναν ενδιάμεσο φαινότυπο καρδιακής ανεπάρκειας ανάμεσα στις HFrEF και HFpEF που θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω καθώς πολλοί ασθενείς με τον καιρό σημειώνουν μεταβολή στο κλάσμα εξώθησης (είτε μείωση είτε αύξηση) [58]. Η HFmrEF εμφανίζει κλινικά χαρακτηριστικά και παράγοντες κινδύνου που είναι συχνά κοινοί για τις HFrEF και HFpEF [58]. Ωστόσο, αν και ακόμη δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι ακριβείς υποκείμενοι μηχανισμοί, φαίνεται ότι η παρουσία διαστολικής δυσλειτουργίας ομοιάζει με αυτή των άλλων μορφών καρδιακής ανεπάρκειας ενώ η διαταραχή στη συστολική λειτουργία ομοιάζει με της HFrEF και ειδικά όταν συνυπάρχει η στεφανιαία νόσος ως ο αιτιολογικός παράγοντας, γεγονός που αποδεικνύεται από την αποτελεσματικότητα θεραπειών για την HFrEF στους ασθενείς με HFmrEF [59].

1.3 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ένα σύνθετο μεταβολικό νόσημα με αυξανόμενη επίπτωση παγκοσμίως και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου καθώς σχετίζεται με την εμφάνιση μικροαγγειακών

(αμφιβληστροειδοπάθεια, νεφροπάθεια, νευροπάθεια) και μακροαγγειακών επιπλοκών (στεφανιαία νόσος, αγγειακή εγκεφαλική νόσος, περιφερική αγγειοπάθεια) λόγω της τοξικής επίδρασης της υπεργλυκαιμίας, γεγονός που τονίζει την ανάγκη για έγκαιρη διάγνωση και εφαρμογή θεραπείας [60]. Ο σακχαρώδης διαβήτης κατηγοριοποιείται ως προς τη παθοφυσιολογία σε αρκετές κατηγορίες που πολλές φορές μοιράζονται χαρακτηριστικά, ωστόσο, οι πιο συχνές μορφές του είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 και ο τύπου 2, που αποτελούν τα δύο άκρα του φάσματος της διαταραχής, ενώ ενδιάμεσα εντοπίζονται και άλλες μορφές όπως ο διαβήτης LADA (latent autoimmune diabetes in adults), MODY (Maturity-Onset-Diabetes of the Young), ο σακχαρώδης διαβήτης της κύησης, ο νεογνικός διαβήτης και ο διαβήτης που οφείλεται σε δευτεροπαθείς βλάβες (στα πλαίσια παγκρεατικής ή ενδοκρινικής νόσου) [60, 61]. Σε κάθε περίπτωση, κυρίαρχο χαρακτηριστικό του σακχαρώδους διαβήτη είναι η διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης και η υπεργλυκαιμία που οφείλεται είτε σε ανεπάρκεια της ινσουλίνης (καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων) είτε σε αντίσταση στη δράση της, ωστόσο, κατά την εξέλιξη της νόσου κυριαρχεί η ανεπαρκής παραγωγή ινσουλίνης λόγω της προοδευτικής βλάβης των β-παγκρεατικών κυττάρων [60, 62]. Η διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες γίνεται αξιολογώντας, πέρα από το ιστορικό και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, τις τιμές γλυκόζης νηστείας και τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) ενώ ένα ακόμη διαγνωστικό τεστ που μπορεί να εφαρμοσθεί είναι η καμπύλη γλυκόζης, η οποία διευκολύνει την ανάδειξη παρουσίας αντίστασης στην ινσουλίνη (διαταραχή της ανοχής στη γλυκόζη) [63].

Η εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 γίνεται συνήθως στην παιδική ηλικία σε άτομα με γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση της νόσου ενώ σύμφωνα με τα μέχρι τώρα επιδημιολογικά δεδομένα η επίπτωση είναι μεγαλύτερη σε χώρες με ψυχρό κλίμα και η πρώτη εμφάνιση συμβαίνει ιδίως τους χειμερινούς και φθινοπωρινούς μήνες [64]. Έχει διατυπωθεί ότι στην παθοφυσιολογία της νόσου εμπλέκονται ισχυρά οι γενετικοί παράγοντες και το οικογενειακό ιστορικό όπως έχει αποδειχθεί από μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα [64, 65]. Ειδικότερα, η γενετική προδιάθεση καθορίζεται σε ποσοστό 30-50% από τα αλληλία HLA DR3/4-DQ8 ή DR4/DR4 και αυξάνει τον κίνδυνο για νόσο επί παρουσίας θετικού οικογενειακού ιστορικού, παρόλα αυτά υπάρχουν και άλλοι γενετικοί τύποι που προσδιορίζουν τον κίνδυνο για την εμφάνιση της νόσου σε μικρότερο βαθμό αλλά και συμμετοχή επιγενετικών τροποποιήσεων γονιδίων-στόχων [65, 66]. Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν λοιμώξεις όπως από εντεροϊούς που συχνά προηγούνται της εμφάνισης των αυτοαντισωμάτων, παράγοντες που σχετίζονται με το μικροβίωμα, παράγοντες που σχετίζονται με τη διατροφή (έκθεση σε δημητριακά) και χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D [67, 68]. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων μέσω πυροδότησης αυτοάνοσων μηχανισμών, που τεκμηριώνεται από την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων (όπως έναντι της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος, του μεταφορέα ψευδαργύρου 8 και της τυροσινικής φωσφατάσης A2) και την ανάγκη για εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης [65, 69]. Η ανίχνευση των προαναφερθέντων αυτοαντισωμάτων μπορεί να βοηθήσει τη σταδιοποίηση του κινδύνου των ατόμων για την εμφάνιση της νόσου [70]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η έκπτωση της λειτουργίας των β-παγκρεατικών κυττάρων γίνεται προοδευτικά τουλάχιστον δύο έτη προ της πρωτοδιάγνωσης (όπου είναι πλέον προχωρημένη), η μείωση της παραγωγής της ινσουλίνης είναι μεγαλύτερη κατά το πρώτο έτος από τη διάγνωση και ο ρυθμός μείωσής της είναι χαμηλότερος στους ενήλικες [71, 72]. Ωστόσο, στα περισσότερα προχωρημένα στάδια της νόσου δεν παράγεται ινσουλίνη παρότι μπορεί να ανιχνεύονται πολύ μικρές ποσότητες πεπτιδίου C, υποδηλώνοντας την πιθανή αναγέννηση των β-παγκρεατικών κυττάρων ή τη διαφυγή τους από τους μηχανισμούς της αυτοανοσίας [73].

Από την άλλη πλευρά, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή διαβήτη παγκοσμίως και εμφανίζει επιδημικές διαστάσεις λόγω της παχυσαρκίας, της καθιστικής ζωής και της αυξημένης ενεργειακής πρόσληψης και, ενώ αφορούσε κυρίως τις μεγαλύτερες ηλικίες, πλέον εμφανίζεται και σε νεότερα ηλικιακά άτομα [74]. Η παθοφυσιολογία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 είναι σύνθετη και περιλαμβάνει περιβαλλοντικούς, γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες που συμμετέχουν στον κίνδυνο για την εμφάνιση της διαταραχής [75]. Το παθοφυσιολογικό υπόστρωμα της νόσου είναι η διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης όπου συμμετέχουν το πάγκρεας και οι περιφερικοί ιστοί (ήπαρ, λιπώδης ιστός, μύες) λόγω ανάπτυξης αντίστασης των περιφερικών στην ινσουλίνη και εμφάνιση υπεργλυκαιμίας παρά την παρουσία επαρκούς παραγωγής ινσουλίνης, αντίθετα με το διαβήτη τύπου 1 [76]. Μάλιστα, η αύξηση της γλυκόζης νηστείας οδηγεί στην αύξηση των βασικών τιμών της ινσουλίνης με συνέπεια τη μειωμένη παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ και την αποθήκευση λίπους σε αυτό δημιουργώντας έναν φύλο κύκλο αντίστασης στην ινσουλίνη και σε υπεργλυκαιμία [77]. Η παχυσαρκία (ιδίως η κεντρικού τύπου παχυσαρκία και ο έκτοπος λιπώδης ιστός όπως στο ήπαρ, τους μύες και το πάγκρεας) απελευθερώνουν μιας σειρά ορμονών (όπως η λεπτίνη, η ρεξιστίνη, η αδιπονεκτίνη) και προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που εμπλέκονται στη δυσλειτουργία του β-παγκρεατικού κυττάρου και την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη [78, 79]. Η σχετιζόμενη με την παχυσαρκία γλυκοτοξικότητα, λιποτοξικότητα και ο συνδυασμός τους ευνοεί την παρουσία ενός περιβάλλοντος οξειδωτικού στρες που επηρεάζει τα β-παγκρεατικά κύτταρα και τα ενδοκυττάρια οργανίδια (όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο) με συνέπεια τη δυσλειτουργία των β-παγκρεατικών κυττάρων [80]. Ακόμη, η γλυκοζυλίωση μοριακών δομών όπως οι πρωτεΐνες (μη-ενζυμική γλυκοζυλίωση) λόγω της υπεργλυκαιμίας (όπως για παράδειγμα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μηχανισμό παραγωγής της κυτταρικής ενέργειας στα μιτοχόνδρια) επιδεινώνουν περαιτέρω το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή και οδηγούν σε βλάβη σε κυτταρικές δομές και στις επιπλοκές του διαβήτη, που μπορεί να παραμένουν και μετά από εντατική θεραπεία της υπεργλυκαιμίας (επιγενετικοί μηχανισμοί μοριακής «μνήμης») [81]. Παράλληλα, η παρουσία υπερινσουλιναιμίας, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπεργλυκαιμία σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και τους μηχανισμούς της φλεγμονής, του οξειδωτικού στρες, της δυσλιπιδαιμίας, της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και της υπερπηκτικότητας με συνέπεια την επιτάχυνση της αθηρωμάτωσης και την ανάπτυξη αγγειακών βλαβών σε όργανα-στόχους [82]. Τέλος, όσο αυξάνεται η διάρκεια της νόσου σημειώνεται μείωση του αριθμού των β-παγκρεατικών κυττάρων και εμφάνιση ανεπάρκειας ινσουλίνης λόγω της τοξικής δράσης της υπεργλυκαιμίας στα παγκρεατικά κύτταρα [83].

1.4 ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Η αρτηριακή υπέρταση είναι ένας από τους σημαντικότερους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου και κατηγοριοποιείται σε δύο μεγάλες ομάδες: την ιδιοπαθή υπέρταση (που αποτελεί περίπου το 90% των περιστατικών, όπου δεν αναγνωρίζεται κάποιο συγκεκριμένο υπεύθυνο αίτιο) και τη δευτεροπαθή υπέρταση (στις υπόλοιπες περιπτώσεις, που οφείλεται σε συγκεκριμένο αίτιο, συνηθέστερα σε νεφροπαρεγχυματικά αίτια, νεφραγγειακά αίτια και σπανιότερα ενδοκρινικά αίτια) [84, 85]. Η αρτηριακή υπέρταση αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία και επιφέρει σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα καθώς είναι υπεύθυνη για την πρόκληση σοβαρών επιπλοκών και βλάβης σε όργανα-στόχους όπως η καρδιά, τα αγγεία, ο εγκέφαλος και ο νεφρός [86]. Μάλιστα, 30-50% της αρτηριακής υπέρτασης έχει κληρονομικό υπόστρωμα ενώ το

υπόλοιπο ποσοστό οφείλεται σε δράσεις περιβαλλοντικών παραγόντων [87]. Η ιδιοπαθής αρτηριακή υπέρταση (για την οποία θα γίνει λόγος στο σημείο αυτό) έχει σύνθετη παθοφυσιολογία και περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση αρκετών παραγόντων όπως η αυξημένη λήψη άλατος, η μειωμένη λήψη καλίου, η αυξημένη δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος, η ενεργοποίηση του άξονα RAAS, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ορμονικοί παράγοντες αλλά και παράγοντες κινδύνου όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, το μεταβολικό σύνδρομο, η αποφρακτική υπνική άπνοια, γενετικοί παράγοντες, φυλετικές διαφορές και επιγενετικές τροποποιήσεις [88-90]. Η υποκείμενη διαταραχή που κυριαρχεί διαφέρει από ασθενή σε ασθενή και συγκεκριμένα, οι αδύνατοι και νεότεροι ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένη καρδιακή παροχή και αιματική ροή προς το νεφρό λόγω αυξημένης δραστηριότητας ρενίνης και κατεχολαμινών, οι μεγαλύτερης ηλικίας έχουν συνήθως χαμηλότερη καρδιακή παροχή, υπερτροφία του μυοκαρδίου και βλάβες σε όργανα-στόχους ενώ από την άλλη οι παχύσαρκοι ασθενείς και λιγότερο οι έγχρωμοι ασθενείς έχουν αυξημένο κυκλοφορούντα όγκο αίματος, σημεία υπερφόρτωσης της κυκλοφορίας και φυσιολογικές ή μειωμένες αγγειακές αντιστάσεις [91].

Η φυσιολογική αρτηριακή πίεση που απαιτείται για την άρδευση των ιστών ρυθμίζεται μέσω των τασεουποδοχέων και ορμονών που καθορίζουν τον αγγειακό τόνο βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα μέσω ελέγχου του όγκου του κυκλοφορούντος αίματος από το νεφρό, όπου κυρίαρχη θέση έχει η ομοιόσταση του νατρίου [92]. Σύμφωνα με τη φυσιολογία, οι μικρές μειώσεις ή αυξήσεις της εξωγενούς πρόσληψης άλατος συνοδεύονται από αντίστοιχες μικρές μειώσεις και αυξήσεις στην απέκκριση άλατος από τους νεφρούς καθώς υπάρχουν μηχανισμοί που προστατεύουν από την απέκκριση του άλατος όπως το σύστημα RAAS, αλλά και το συμπαθητικό σύστημα, που αναπτύχθηκαν από τα προϊστορικά χρόνια, όπου η κατανάλωση άλατος ήταν πολύ χαμηλή ώστε να διατηρείται η πίεση εντός φυσιολογικών ορίων [89, 93]. Παρόλα αυτά, η υπερκατανάλωση άλατος, η πτωχή σε κάλιο διατροφή και ο σύγχρονος τρόπος ζωής που χαρακτηρίζεται από την έλλειψη άσκησης σχετίζονται χρονίως με την ανάπτυξη υπέρτασης σύμφωνα με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας [94]. Παθοφυσιολογικά, στην ιδιοπαθή υπέρταση απαιτείται μεγαλύτερη αρτηριακή πίεση ώστε να επιτευχθεί απέκκριση του νατρίου από ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες και αυτό υποδηλώνεται από την αύξηση της δραστηριότητας του συστήματος RAAS και του συμπαθητικού [95]. Προϊόντος του χρόνου, η χρονίως αυξημένη αρτηριακή πίεση σχετίζεται με την ανάπτυξη βλάβης στα αγγεία του νεφρού, διάμεσης ίνωσης, νεφροσκλήρυνσης, πρωτεинуρίας και με προοδευτική έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας [96].

Από την άλλη πλευρά, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σχετίζεται με τη μειωμένη παραγωγή NO, προστακυκλίνης και με αυξημένη παραγωγή αγγειοσυσπαστικών ουσιών όπως η ET-1 και η θρομβοξάνη A2 με συνέπεια την αύξηση του αγγειακού τόνου, της καρδιακής παροχής και της αρτηριακής πίεσης ειδικά με την αύξηση της ηλικίας [97]. Ακόμη, στα πλαίσια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας υπάρχει παρουσία ενός μικροπεριβάλλοντος φλεγμονής στα αγγεία και στο διαμεσο-σωληναριακό χώρο του νεφρού, όπως αντικατοπτρίζεται από τη διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων (T λεμφοκύτταρα που στοχεύουν κυτταρικά αντιγόνα) αλλά και αυξημένου οξειδωτικού στρες που οδηγούν στην αγγειοσύσπαση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των λείων μυικών ινών των αγγείων και την περαιτέρω αγγειακή βλάβη [98-100]. Η φλεγμονή είναι κυρίαρχη σε καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, η δυσλιπιδαιμία και η ενεργοποίηση νευροορμονικών μηχανισμών με αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροκινών από το λιπώδη ιστό (αδипοκίνες, πχ. λεπτίνη) που επιδεινώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία και συμμετέχουν στην αρτηριακή αναδιαμόρφωση (αρτηριακή σκληρία) και την πρόοδο της αθηρωμάτωσης [101, 102]. Συχνά η υπέρταση κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι ανθεκτική στη χορηγούμενη αγωγή και απαιτεί το συνδυασμό θεραπευτικών ουσιών [103]. Τέλος, η

αρτηριακή υπέρταση σχετίζεται με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και του μηχανισμού της αιμόστασης με συνέπεια την πρόκληση αγγειακής βλάβης στα όργανα-στόχους [104].

1.5 ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ

Η δυσλιπιδαιμία είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για το καρδιαγγειακό σύστημα και μια ετερογενής διαταραχή που οφείλεται σε αίτια σχετιζόμενα με γενετικούς παράγοντες και τον τρόπο ζωής, που αυξάνουν τα λιπίδια του ορού, τα οποία μετρώνται εργαστηριακά με τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης, της HDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων [105, 106]. Φυσιολογικά, η χοληστερόλη έχει διττή προέλευση καθώς λαμβάνεται εξωγενώς από την τροφή (σε ποσοστό 15-20%), απορροφάται από το λεπτό έντερο και μέσω των υποδοχέων LDL ενδοκυτταρώνεται από τα κύτταρα όπου και χρησιμοποιείται, ενώ από την άλλη συντίθεται από το ήπαρ με σύνθετες ενζυμικές διεργασίες. Οι μηχανισμοί απορρόφησης και βιοσύνθεσής της υπόκεινται σε παλίνδρομη ρυθμίση ώστε να διατηρούνται σταθερά επίπεδα χοληστερόλης στον ορό [107]. Η χοληστερόλη συμμετέχει σε απαραίτητες κυτταρικές διαδικασίες όπως η σύνθεση των στεροειδών ορμονών, είναι συστατικό της χολής, των χολικών οξέων, αποτελεί δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών ρυθμίζοντας τη ρευστότητά τους και συμμετέχει στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση [107]. Τα τριγλυκερίδια είναι πηγή λιπαρών οξέων, απορροφώνται από το λεπτό έντερο και συντίθενται ενζυμικά στο ήπαρ, αποτελούν την κύρια μορφή αποθήκης και μεταφοράς ενέργειας (ως λιπαρά οξέα) και χρησιμοποιούνται από τους μύες και τον λιπώδη ιστό [108]. Η χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια κυκλοφορούν στο αίμα ως ένας υδροφοβός πυρήνας που περιβάλλεται από υδρόφιλα μόρια λιποπρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων, που συνδέονται σε υποδοχείς στα κύτταρα-στόχους ενώ ανάλογα με το μέγεθος, τη λειτουργία και την πυκνότητα των λιποπρωτεϊνών, αυτές κατατάσσονται στα χυλομικρά, τις λιποπρωτείνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL), χαμηλής πυκνότητας (LDL) και υψηλής πυκνότητας (HDL) [109]. Η κύρια λιποπρωτεΐνη που συντίθενται από το ήπαρ είναι η VLDL (πλούσια σε τριγλυκερίδια, εστέρες χοληστερόλης και σε απολιποπωτεΐνη B (apoB100), ενώ προοδευτικά μετατρέπεται προς τους περιφερικούς ιστούς σε IDL και σε LDL χοληστερόλη (με αύξηση του περιεχομένου της σε εστέρες χοληστερόλης και μείωση στα τριγλυκερίδια) [110]. Τα κύτταρα προσλαμβάνουν την LDL χοληστερόλη κατόπιν πρόσδεσης στους υποδοχείς της και, μάλιστα, οι LDL υποδοχείς ανακυκλώνονται συνεχώς επί της επιφάνειας των κυττάρων, ωστόσο αυτή η δράση επηρεάζεται από την πρωτεΐνη PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) που συνδεόμενη με τους LDL υποδοχείς τους οδηγεί προς καταστροφή στα λυσοσώματα [111, 112]. Από την άλλη, η HDL χοληστερόλη σχετίζεται με την ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης από την περιφέρεια προς το ήπαρ και έχει συνδεθεί με καρδιαγγειακό όφελος επί αυξημένων τιμών αυτής (ωστόσο, το όφελος καθορίζεται περισσότερο από τη σύσταση της HDL παρά από τα επίπεδά της) [113]. Τέλος, η λιποπρωτεΐνη α (Lpα), παρότι έχει παρόμοια σύσταση σε χοληστερόλη με την LDL, περιέχει ένα τροποποιημένο μόριο apoB100, τα επίπεδά της καθορίζονται γενετικά και έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για αθηροσκληρωτική καρδιοπάθεια [114].

Συνηθέστερα η δυσλιπιδαιμία αποδίδεται σε δευτεροπαθείς καταστάσεις όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, το μεταβολικό σύνδρομο, η παχυσαρκία, οι νόσοι του θυρεοειδούς, το νεφρωτικό σύνδρομο, η χρόνια νεφρική νόσος, ηπατικές νόσοι, φαρμακευτικοί παράγοντες, το κάπνισμα, η κατάχρηση αλκοόλης, η έλλειψη άσκησης και η αυξημένη σε

λιπαρά διατροφή, ωστόσο, οφείλεται και σε μεταλλάξεις κληρονομικώς μεταβιβαζόμενες όπως οι μεταλλάξεις στα γονίδια LDLR (υποδοχέας της LDL), στην apoB και στο ένζυμο PCSK9 που συμμετέχουν στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία [105, 115, 116]. Ο κατάλογος των γενετικώς καθοριζόμενων διαταραχών των λιπιδίων είναι μεγάλος και πέραν της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας αναφέρονται συνοπτικά η οικογενής χυλομικροναιμία και η έλλειψη της λυσοσωμικής λιπάσης μεταξύ των πολλών διαταραχών [117]. Πέραν των μεμονωμένων μεταλλάξεων, υπάρχουν πολυγονιδιακώς καθοριζόμενες διαταραχές των λιπιδίων [118, 119]. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, συνυπάρχει κάποιο γενετικό υπόβαθρο για τη διαταραχή σε συνδυασμό με παραμέτρους του τρόπου ζωής [120]. Οι δυσλιπιδαιμίες στο παρελθόν ταξινομούσαν με βάση το φαινότυπό τους σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση Frederickson σε 5 ομάδες, ωστόσο, αυτή η προσέγγιση τείνει να εγκαταλειφθεί λόγω της δυσχέρειας του εργαστηριακού προσδιορισμού ορισμένων λιποπρωτεϊνών αλλά και της πολυγονιδιακής βάσης της δυσλιπιδαιμίας [121, 122]. Συνεπώς, εργαστηριακά διαγιγνώσκονται στη βάση της ανεύρεσης διαταραχών όπως η χαμηλή HDL, η υψηλή LDL χοληστερόλη, η αυξημένη ολική χοληστερόλη και τα αυξημένα τριγλυκερίδια είτε ως συνδυασμοί είτε λιγότερο συχνά ως μεμονωμένες διαταραχές τους, ανάλογα με το υποκείμενο αίτιο ενώ υπάρχει η δυνατότητα διενέργειας γενετικού ελέγχου σε ειδικές περιπτώσεις [105, 117].

Η δυσλιπιδαιμία έχει συνδεθεί παθοφυσιολογικά με την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης (όπως έχει ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο της στεφανιαίας νόσου), αγγειακών βλαβών σε ποικίλλα όργανα και με τον κίνδυνο για αγγειακά συμβάματα γεγονός που απαιτεί φαρμακευτική αντιμετώπιση πέραν των αλλαγών στον τρόπο ζωής [105, 123]. Ειδικά οι αυξημένες τιμές LDL χοληστερόλης σε συνδυασμό με τους υπόλοιπους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου ευνοούν την ανάπτυξη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας καθότι τα οξειδωμένα μόρια LDL έχουν τη δυνατότητα προσέκλυσης μακροφάγων και δημιουργίας των αφρωδών κυττάρων που εκλύουν μια σειρά προφλεγμονωδών μεσολαβητών με συνέπεια τη δημιουργία του αθηρώματος και προοδευτικά την εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας και την αθηροθρόμβωση [120]. Επιπλέον, πέραν της γνωστής σχέσης της LDL με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, η χαμηλή HDL, τα αυξημένα τριγλυκερίδια και η αυξημένη Lp(a) έχουν συνδεθεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο και μελετώνται ως στόχοι υποψήφιων φαρμάκων [122]. Χαρακτηριστικά, τα τριγλυκερίδια συμμετέχουν στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, τη θρόμβωση και τη φλεγμονή με έμμεσους μηχανισμούς ενώ οι VLDL εμπλέκονται στην αθηρογένεση μέσω της συσσώρευσης στο αγγειακό τοίχωμα των μικρών, πυκνών LDL μορίων [124, 125].

1.6 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΕΜΒΟΛΗ

Η φλεβική θρομβοεμβολική νόσος είναι μια παθολογική οντότητα που συχνά υποδιαγιγνώσκεται και αφορά σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα 10 εκατομμύρια νέους ασθενείς κάθε έτος ενώ εκδηλώνεται κλινικά με την μορφή της πνευμονικής εμβολής και της εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης, που συχνά μπορεί να συνυπάρχουν [126]. Η παθοφυσιολογία της πνευμονικής εμβολής στηρίζεται στην τριάδα του Virchow που περιλαμβάνει την ύπαρξη ενδοθηλιακής βλάβης, της υπερπηκτικότητας και της φλεβικής στάσης που ευνοούν τη δημιουργία θρόμβων [127]. Τα αίτια της πνευμονικής εμβολής μπορεί να είναι επίκτητα ή κληρονομικώς καθοριζόμενα (π.χ. παχυσαρκία, κύηση, ακινητοποίηση, τραύμα ή μείζον χειρουργείο, ενεργός κακοήθεια, καρδιακή ανεπάρκεια, λήψη οιστρογόνων, μεταλλάξεις γονιδίων όπως στις διάφορες μορφές θρομβοφιλίας, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και η παρουσία ενδαγγειακών καθετήρων) [127]. Στις

περισσότερες περιπτώσεις στην πνευμονική εμβολή ο θρόμβος δημιουργείται εντός του φλεβικού δικτύου των κάτω άκρων (συνηθέστερα οι εν τω βάθει φλέβες της γαστροκνημίας) και μεταναστεύει προς την πνευμονική κυκλοφορία όπου αποφράσσει κάποιον κλάδο του πνευμονικού αρτηριακού αγγειακού δικτύου με συμπτωματολογία αντίστοιχη με το μέγεθος του αγγειακού κλάδου που έχει αποφραχθεί και που κυμαίνεται από ήπια συμπτωματολογία έως απειλητική για τη ζωή [127].

Κυρίαρχο παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό στην πνευμονική εμβολή είναι η υποξία λόγω της παθολογικής ανταλλαγής αερίων και η διαταραχή της σχέσης αερισμού-αιμάτωσης που εξαρτάται από την έκταση της θρόμβωσης εντός του πνευμονικού αγγειακού δικτύου, την καρδιακή λειτουργικότητα και την εφεδρεία του αναπνευστικού συστήματος [128]. Συγκεκριμένα, σε ορισμένες πνευμονικές θέσεις η αιματική ροή ανακατανέμεται προς τις θέσεις που δεν υπάρχει θρόμβος ενώ σε άλλες περιοχές η σχέση αερισμού-αιμάτωσης παραμένει φυσιολογική ενώ ταυτόχρονα ο προκαλούμενος βρογχόσπασμος οδηγεί στην ατελεκτασία πνευμονικών τμημάτων και σε επιδείνωση της υποξίας (πρόκληση shunt) [129]. Λόγω των αυξημένων πιέσεων εντός του δεξιού κόλπου μπορεί να προκληθεί ενδοκαρδιακό shunt (ροή από δεξιά προς τα αριστερά) και επιδείνωση περαιτέρω της υποξίας επί εδάφους ανοιχτού ωοειδούς τρήματος [130, 131]. Ακόμη, επιβαρύνεται η λειτουργία της δεξιάς κοιλίας λόγω της αύξησης του μεταφορτίου (πνευμονικές αγγειακές αντιστάσεις) τόσο μηχανικά λόγω της θρόμβωσης αλλά και λόγω της απελευθέρωσης αγγειοσυσπαστικών μορίων όπως η θρομβοξάνη A₂, η σεροτονίνη, η ενδοθηλίνη και η ισταμίνη [132, 133]. Προοδευτικά, επιδεινώνεται η ιστική άρδευση και συμβαίνει μυοκαρδιακή ισχαιμία με συνέπεια την επιδείνωση της συσπαστικότητας της δεξιάς κοιλίας (λόγω της προοδευτικής διάτασής της) και τη μείωση της καρδιακής παροχής ενώ παράλληλα ευνοείται το έδαφος για την εκδήλωση αρρυθμιών [134]. Τέλος, η διάταση της δεξιάς κοιλίας επιβαρύνει τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας με αποτέλεσμα την αύξηση των πιέσεων πλήρωσης της αριστερής κοιλίας και τη μείωση της καρδιακής παροχής [135].

1.7 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Η πνευμονική υπέρταση είναι μια κλινική διαταραχή που προκαλείται από μια ποικιλία αιτίων και κατηγοριοποιείται στις εξής ομάδες: την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (Ομάδα 1), την πνευμονική υπέρταση που οφείλεται σε παθολογία της αριστερής κοιλίας (Ομάδα 2), την πνευμονική υπέρταση που σχετίζεται με αναπνευστικά νοσήματα (Ομάδα 3), την πνευμονική υπέρταση που οφείλεται σε χρόνια θρομβοεμβολική νόσο (Ομάδα 4) και τέλος την πνευμονική υπέρταση που αποδίδεται σε πολυπαραγοντικά αίτια (Ομάδα 5) [136]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (στην οποία θα γίνει αναφορά στο σημείο αυτό) είναι μια σπάνια κλινική οντότητα και η επίπτωσή της υπολογίζεται στα 1-2 άτομα ανά εκατομμύριο ετησίως ενώ ποσοστό 12% αποδίδεται σε γενετικές μεταλλάξεις [137]. Είναι πιο συχνή σε γυναίκες και πέραν των σπάνιων γενετικών αιτίων και των περιπτώσεων όπου δεν ανευρίσκεται σαφές αίτιο, στις υπόλοιπες περιπτώσεις ανήκουν φαρμακευτικοί παράγοντες και τοξίνες, η λοίμωξη HIV και σπανιότερες λοιμώξεις (π.χ. σχιστοσωμίαση), συγγενείς καρδιοπάθειες, νόσοι του συνδετικού ιστού και η πυλαία υπέρταση [138].

Η παθοφυσιολογία της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης είναι σύνθετη και αποδίδεται στην αναδιαμόρφωση των πνευμονικών αγγείων και στην αύξηση των πνευμονικών αγγειακών αντιστάσεων που οδηγεί στην προοδευτική ανάπτυξη

δυσλειτουργίας της δεξιάς κοιλίας λόγω της αύξησης των πιέσεων στην πνευμονική αρτηρία, καθώς φυσιολογικά οι αντιστάσεις στο πνευμονικό αρτηριακό δίκτυο είναι μικρότερες από ότι στη συστηματική κυκλοφορία [138]. Η δυσλειτουργία της δεξιάς κοιλίας μπορεί να επηρεάσει και την αριστερή κοιλία με συνέπεια τη μειωμένη καρδιακή παροχή ενώ η προκαλούμενη υπόταση επιδεινώνει την άρδευση των στεφανιαίων αγγείων και προκαλεί μυοκαρδιακή ισχαιμία [139]. Κυρίαρχη θέση έχει η αγγειοσύσπαση και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία όπου εμπλέκονται οι μηχανισμοί της αρτηριακής θρόμβωσης και της φλεγμονής λόγω απελευθέρωσης μιας σειράς μεσολαβητών [140]. Το αρχικό στάδιο της διαταραχής αφορά τη μετανάστευση των μυοινοβλαστών στον έσω χιτώνα των πνευμονικών αρτηριών και την ανάπτυξη των χαρακτηριστικών βλαβών της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης που είναι οι πλεξογενείς βλάβες (που πρόκειται για την προοδευτική στένωση του αυλού των αγγείων λόγω ίνωσης, υπερτροφίας του έσω χιτώνα και απόφραξης των μικρών αρτηριών) [141]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι πλεξογενείς βλάβες είναι ένας παθολογικός μηχανισμός απάντησης στην υποξία και την ισχαιμία [142]. Ταυτόχρονα, η αυξημένη αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων λόγω της απελευθέρωσης σεροτονίνης και ιστικού αναστολέα του πλασμινογόνου οδηγεί στη δημιουργία θρομβώσεων [143]. Όσον αφορά την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η απελευθέρωση αγγειοσυσπαστικών ουσιών όπως η ET-1 και η θρομβοξάνη υπερτερεί σε σχέση με το NO και την προστακυκλίνη με συνέπεια την αγγειοσύσπαση και την κυριαρχία των μιτογόνων δράσεων [144]. Τέλος, όσον αφορά την αγγειακή αναδιαμόρφωση, μεταλλάξεις που αφορούν γονίδια της οικογένειας του παράγοντα αύξησης των όγκων β (TGF- β) σχετίζονται με την υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων και των λείων μυικών ινών στην πνευμονική αρτηριακή κυκλοφορία [145].

1.8 ΒΑΛΒΙΔΟΠΑΘΕΙΕΣ

Οι βαλβιδοπάθειες είναι σύνθετα καρδιαγγειακά νοσήματα με παγκόσμια κατανομή που αποδίδονται σε μια σειρά αιτίων που προκαλούν είτε στένωση είτε ανεπάρκεια κάποιας από τις βαλβίδες της καρδιάς, ωστόσο, η συχνότερη βαλβιδοπάθεια σύμφωνα με τη βιβλιογραφία για τον ανεπτυγμένο κόσμο είναι η στένωση της αορτικής βαλβίδας, της οποίας η εμφάνιση αυξάνεται λόγω της γήρανσης του πληθυσμού και της αθηρωμάτωσης [146]. Η στένωση της αορτικής βαλβίδας αφορά περισσότερο από 2% των ατόμων άνω των 60 ετών και οι ασθενείς παρουσιάζουν θνητότητα σχεδόν 50% ειδικά στα προχωρημένα στάδια [147]. Η στένωση της αορτικής βαλβίδας έχει μια προοδευτική εξέλιξη ξεκινώντας από τη δημιουργία σκληρυντικών βλαβών στις αορτικές πτυχές, που προϊόντος του χρόνου, εξελίσσονται στον περιορισμό της αιματικής ροής δια της αορτικής βαλβίδας και στην εκδήλωση συμπτωμάτων [147]. Η στένωση της αορτικής βαλβίδας εμφανίζει πολλά κοινά σημεία με την αθηρωμάτωση και παραπλήσιους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς και μοιράζονται παράγοντες κινδύνου όπως η υπέρταση, το κάπνισμα, το αυξημένο σωματικό βάρος, η δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης και η αυξημένη Lp(a) [148].

Όσον αφορά τη παθοφυσιολογία, η αρχική βλάβη αφορά την παρουσία ενδοθηλιακής βλάβης επί των βαλβιδικών πτυχών (φυσιολογικά, οι βαλβίδες καλύπτονται από ενδοθηλιακά κύτταρα στις δυο τους πλευρές και αποτελούνται από διάμεσο ιστό) ενώ η συνακόλουθη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία προσελκύει φλεγμονώδη κύτταρα, οδηγεί στη διαφοροποίηση των κυττάρων του διάμεσου χώρου σε μυοινοβλάστες/οστεοβλάστες και στην εναπόθεση ασβεστίου (αποτίτάνωση) [149]. Η αρχική βλάβη ξεκινά με την εναπόθεση λιπιδίων (οξειδωμένα μόρια LDL χοληστερόλης) που πυροδοτούν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την φλεγμονή, όπως συμβαίνει στην αθηρωμάτωση. Μάλιστα, τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια μετατρέπονται σε λυσοφωσφατιδιλοχολίνη από το ένζυμο

λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A₂ (Lp-PLA₂), οδηγούν στην απόπτωση των διάμεσων κυττάρων και στη δημιουργία των σκληρυντικών αλλοιώσεων [150]. Κατόπιν, ενεργοποιούνται τα μακροφάγα και μια σειρά προ-φλεγμονωδών μορίων που προσελκύουν τα ανοσολογικά κύτταρα και στα πιο σημαντικά μόρια ανήκουν οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB (πυρηνικός παράγοντας κάππα Β) και οι TLRs (toll-like receptors) [151]. Η επαγόμενη από τη φλεγμονή κυτταρική απόπτωση πυροδοτεί τη δημιουργία κρυστάλλων υδροξυαπατίτη εντός της βαλβίδας και την περαιτέρω καταστροφή της καθώς ενεργοποιούνται οι ανοσολογικοί μηχανισμοί και ένας φαύλος κύκλος επιδείνωσης της βαλβιδικής αρχιτεκτονικής [152]. Τέλος, σημαντικοί μεσολαβητές στην παθοφυσιολογία της στένωσης της αορτικής βαλβίδας είναι τα μη-κωδικά RNA (ncRNA), τα οποία αν και δεν είναι υπεύθυνα για την έκφραση κάποιου γονιδίου, έχουν ρυθμιστικό ρόλο επί της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στους υποκείμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της στένωσης, όπως για παράδειγμα τα microRNA (miR), που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των μυοινοβλαστών [153]. Τέλος, ο περιορισμός της αιματικής ροής δια της βαλβίδας εμπλέκεται στην υπερτροφία του μυοκαρδίου λόγω του αυξημένου μεταφορτίου, στη διαστολική δυσλειτουργία και την καρδιακή ανεπάρκεια [154].

1.9 ΚΟΛΠΙΚΗ ΜΑΡΜΑΡΥΓΗ

Η κολπική μαρμαρυγή είναι μία από τις συχνότερες αρρυθμίες και πέρα από ιδιοπαθή αίτια, έχει συσχετισθεί με την αύξηση της ηλικίας, το ανδρικό φύλο, την παχυσαρκία, το σακχαρώδη διαβήτη, το κάπνισμα, την καθιστική ζωή, την αποφρακτική υπνική άπνοια, την υπέρταση, που αποτελούν τους πιο συχνούς παράγοντες κινδύνου, ενώ το παθοφυσιολογικό υπόστρωμά της αφορά την παρουσία δομικής και ηλεκτρικής διαταραχής των κόλπων που συνεισφέρουν στη γένεση ενός ανώμαλου καρδιακού ρυθμού [155]. Η αναγνώριση και αντιμετώπιση της κολπικής μαρμαρυγής είναι απαραίτητη καθώς σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα ενώ στις σοβαρότερες επιπλοκές της αποτελεί η πρόκληση αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων λόγω της προδιάθεσης για δημιουργία αρτηριακού θρόμβου αλλά και νευρολογικής διαταραχής όπως η απώλεια των γνωστικών ικανοτήτων [156, 157]. Ακόμη, είναι συχνή η εμβολή και σε άλλες αγγειακές θέσεις όπως τα περιφερικά και σπλαγγχικά αγγεία καθώς επίσης και η συσχέτισή της με την εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας [158, 159].

Στην κολπική μαρμαρυγή διαταράσσεται η φυσιολογική παραγωγή του ηλεκτρικού ερεθίσματος από τους κόλπους και η σύζευξη ανάμεσα στην κολπική και κοιλιακή ηλεκτρική διέγερση με συνέπεια την πρόκληση αρρυθμίας [160]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η γένεση των ανώμαλων ηλεκτρικών ερεθισμάτων (παροξυσμική κολπική μαρμαρυγή) ξεκινά από περιοχές όπως τα στόμια των πνευμονικών φλεβών που μπορούν να αντιμετωπισθούν μέσω επεμβατικών τεχνικών όπως η κατάλυση (ablation), και το υπόστρωμά τους αφορά την παθολογική διαχείριση των ιόντων ασβεστίου με συνέπεια την παθολογική ηλεκτρική διέγερση και επαναπόλωση [161]. Έχει διατυπωθεί ότι είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της παθολογικής αυτής κατάστασης η παρουσία ανατομικής και αρχιτεκτονικής διαταραχής των κόλπων, που συντηρούν μηχανισμούς επανεισόδου του παθολογικού ερεθίσματος [162]. Χαρακτηριστικά, υπάρχουν παθολογικές διαταραχές όπως η ίνωση και η αλλαγή στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (παρουσία μη-κολλαγονικών εναποθέσεων) που επηρεάζουν την ανερέθιστη περίοδο των κολπικών μυοκαρδιακών κυττάρων [160]. Επιπροσθέτως, στα πλαίσια της παρουσίας παραγόντων κινδύνου, έχει διαπιστωθεί ότι η ενεργοποίηση μηχανισμών όπως το σύστημα RAAS σχετίζονται με την παθολογική αναδιαμόρφωση και την ίνωση και τη διήθηση με φλεγμονώδη κύτταρα [163].

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το «φλεγμονόσωμα» NLRP3 αποτελείται από μεσολαβητές που ενορχιστρώνουν τη φλεγμονή στα μυοκαρδιακά κύτταρα των κόλπων [164]. Επιπλέον, μια πληθώρα μεσολαβητών όπως ο TNF-α, η αδιπονεκτίνη, οι IL-6 και 10, το ουρικό οξύ, τα οξειδωμένα μόρια της LDL χοληστερόλης και ορμόνες όπως η γκρελίνη παρουσιάζουν αυξημένες τιμές στην κολπική μαρμαρυγή στα πλαίσια του μεταβολικού συνδρόμου [165]. Αν και είχε διατυπωθεί στο παρελθόν ότι η κολπική μαρμαρυγή ξεκινά ως παροξυσμική κολπική μαρμαρυγή, που προιόντος του χρόνου μεταπίπτει σε μόνιμη κολπική μαρμαρυγή, φαίνεται ότι η φυσική ιστορία της διαταραχής είναι περισσότερο σύνθετη καθώς η εμμένουσα κολπική μαρμαρυγή μπορεί να μεταπέσει σε παροξυσμική αλλά, επίσης, η εντατική αντιμετώπιση των παραγόντων κινδύνου και των εκλυτικών αιτιών μπορεί να μεταβάλει το φορτίο της νόσου [166, 167]. Τέλος, περισσότεροι από 100 γενετικοί τόποι που συμμετέχουν στους μηχανισμούς της φλεγμονής, της αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου και την ηλεκτρική δραστηριότητα σχετίζονται με την κολπική μαρμαρυγή [168].

1.10 ΚΑΡΔΙΟ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ

Λόγω των εξελίξεων στη θεραπεία των ογκολογικών περιστατικών και της αποτελεσματικότητας των σύγχρονων αντικαρκινικών θεραπειών όπως η ανοσοθεραπεία, οι βιολογικές θεραπείες, η ακτινοθεραπεία και οι χημειοθεραπείες, υπάρχει αύξηση του αριθμού των ασθενών με κακοήγη νοσήματα που επιβιώνουν και αύξηση των πασχόντων που εμφανίζουν καρδιοτοξικότητα από τις χορηγούμενες θεραπείες [169]. Η καρδιοτοξικότητα μπορεί να εκδηλωθεί οποιαδήποτε χρονική στιγμή από τη λήψη της θεραπείας επιβάλλοντας την ανάγκη για καρδιολογική παρακολούθηση των ασθενών που προκειται να υποβληθούν σε θεραπείες με δυνητικά γνωστή καρδιοτοξικότητα, και τη χορήγηση κατάλληλης θεραπείας εφόσον αυτή αναδειχθεί [169, 170]. Έχει περιγραφεί ότι η συχνότητα εμφάνισης καρδιοτοξικότητας στους ασθενείς που επιβιώνουν από ογκολογικά νοσήματα είναι μεγαλύτερη από τη συχνότητα υποτροπής του καρκίνου και, μάλιστα, το πρόβλημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους ασθενείς που λαμβάνουν καρδιοτοξικές θεραπείες σε παιδική ηλικία και επιζούν για πολλά χρόνια μετά από αυτές [170, 171]. Στους πιο συχνά ενοχοποιούμενους φαρμακευτικούς παράγοντες που σχετίζονται με την πρόκληση καρδιοτοξικότητας ανήκουν οι ανθρακυκλίνες, οι αλκυλιούντες παράγοντες, οι αντιμεταβολίτες, η φαρμακευτική κατηγορία των πλατινών, οι ταξάνες, οι βιολογικοί παράγοντες όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του υποδοχέα του ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα-2 (HER2), έναντι του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF-A), οι αναστολείς της τυροσινικής κίνησης, η ανοσοθεραπεία που στοχεύει τα μόρια PD-1 (πρωτεΐνη κυτταρικού θανάτου) και CTLA-4 (πρωτεΐνη 4 που σχετίζεται με τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα) και η ακτινοβολία [169, 172].

Οι μηχανισμοί πρόκλησης μυοκαρδιακής βλάβης είναι πολλοί και διαφέρουν ανάλογα με τη χορηγούμενη θεραπεία και το χρονικό διάστημα εμφάνισής της, ωστόσο, περιλαμβάνουν είτε την πρόκληση άμεσης μυοκαρδιακής τοξικότητας/βλάβης, είτε έμμεση βλάβη όπως η μυοκαρδίτιδα, η εμφάνιση αρτηριακής υπέρτασης, τα θρομβοεμβολικά επεισόδια και η πρόκληση ισχαιμίας [172]. Οι προκαλούμενες βλάβες αφορούν συχνά όχι μόνο το μυοκάρδιο, αλλά μπορεί να περιλαμβάνουν και δομές όπως τα αγγεία, το περικάρδιο και τις βαλβίδες της καρδιάς [173]. Οι βλάβες μπορεί να είναι αναστρέψιμες και μη αναστρέψιμες, όπως συμβαίνει με τις ανθρακυκλίνες [174]. Γενικά, τα παθοφυσιολογικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην πρόκληση καρδιοτοξικότητας περιλαμβάνουν την κυτταρική νέκρωση/απόπτωση (με δόσοεξαρτώμενο τρόπο) λόγω οξειδωτικής βλάβης στο μυοκάρδιο και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (ανθρακυκλίνες), τον σπασμό των

στεφανιαίων αγγείων και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (αντιμεταβολίτες), την μυοκαρδίτιδα και το κυτταρικό οίδημα/φλεγμονή (αλκυλιούντες παράγοντες), την περικαρδίτιδα και την καρδιακή ανεπάρκεια (όπως η πλατίνα), τη βλάβη στους μηχανισμούς της νεοαγγειογένεσης (rarefaction), την πρόκληση υπέρτασης και θρομβώσεων (αντι-VEGF-A παράγοντες), την αναστολή των μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης (αντι-HER2 παράγοντες) που αν και δεν προκαλούν άμεση μυοκαρδιακή βλάβη επιδεινώνουν την μυοκαρδιακή βλάβη που προκαλείται από τη χορήγηση άλλων κυτταροτοξικών θεραπειών όπως οι ανθρακυκλίνες ή τη μυοκαρδιακή λειτουργία σε άτομα με προυπάρχουσα μυοκαρδιακή δυσλειτουργία και τέλος την πρόκληση θρομβοεμβολικών επεισοδίων (αναστολείς τυροσινικής κινάσης) [174-177].

1.11 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ

Η περιφερική αγγειακή νόσος (ή περιφερική αγγειοπάθεια) είναι μία νόσος που αφορά τα περιφερικά αγγεία και αναφέρεται στη στένωση ή απόφραξη των αρτηριών και συνηθέστερα των αρτηριών των κάτω άκρων (ωστόσο μπορεί να αφορά την κοιλιακή αορτή και άλλα περιφερικά αγγεία) και μπορεί να είναι είτε συμπτωματική είτε ασυμπτωματική [178]. Ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται με την ηλικία (40% των ατόμων άνω των 80 ετών πάσχει από περιφερική αγγειοπάθεια), αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα που συνεισφέρει στον καρδιαγγειακό κίνδυνο ενός ατόμου και σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα, θνησιμότητα και πτωχή ποιότητα ζωής [178, 179]. Οι συνηθέστεροι παράγοντες κινδύνου για την περιφερική αγγειοπάθεια είναι κοινοί με άλλων καρδιαγγειακών νοσημάτων που συμμετέχουν στην αθηρωμάτωση (πχ. αρτηριακή υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, σακχαρώδης διαβήτης, κάπνισμα, αυξημένη ηλικία, παρουσία θετικού οικογενειακού ιστορικού) και πλην της αθηρωμάτωσης και της αθηροθρόμβωσης, εμπλέκονται οι αγγειίτιδες και η θρόμβωση στα πλαίσια καταστάσεων υπερπηκτικότητας [180, 181]. Η αναγνώριση της περιφερικής αγγειοπάθειας μπορεί να γίνει με διάφορες τεχνικές και με χρήση βιοδεικτών [182].

Υπό την επίδραση των παραγόντων κινδύνου δημιουργούνται οι αθηρωματικές αλλοιώσεις στα περιφερικά αγγεία με μηχανισμούς που αφορούν τη φλεγμονή, την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, το οξειδωτικό στρες, την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την νεοαγγειογένεση [183]. Αρχικά, αναπτύσσεται η αθηρωματική πλάκα και τα αγγεία διατείνονται ώστε να διατηρηθεί σταθερό το εύρος του αυλού, παρόλα αυτά, σε προχωρημένα στάδια το αθήρωμα λαμβάνει μεγαλύτερες διαστάσεις αποφράσσοντας τον αυλό [184]. Πι είναι της προοδευτικής στένωσης του αρτηριακού αυλού, μπορεί να συμβεί θρόμβωση ή εμβολή με αποτέλεσμα την πρόκληση οξείας ισχαιμίας που απειλεί τη βιωσιμότητα του μέλους [184]. Ο περιορισμός της αιματικής ροής και η αναντιστοιχία ανάμεσα στην παροχή αίματος και θρεπτικών συστατικών σε σχέση με τις ζητούμενες ανάγκες είναι υπεύθυνος για την πρόκληση άλγους που είναι το χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα της νόσου (διαλείπουσα χωλότητα) [184]. Η προοδευτική ανάπτυξη αρτηριακής στένωσης σχετίζεται με την πυροδότηση της νεοαγγειογένεσης με σκοπό την παροχή αίματος προς το πάσχον μέλος, παρόλα αυτά, στα τελικά στάδια της νόσου όταν έχουν αναπτυχθεί σοβαρού βαθμού στενώσεις αυτοί οι μηχανισμοί είναι ανεπαρκείς και προκαλείται ισχαιμία ακόμη και στην ηρεμία, χωρίς κόπωση του πάσχοντος μέλους, γεγονός που οδηγεί σε απώλεια ιστού (γάγγραινα) [183]. Μάλιστα, ο περιορισμός της αιματικής ροής σχετίζεται με την πρόκληση βλάβης στους σκελετικούς μύες των κάτω άκρων στα πλαίσια της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες όπως τεκμηριώνεται από την παρουσία μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (παρουσία δομικών και λειτουργικών, ενζυμικών βλαβών) των σκελετικών μυών [185, 186].

2. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ: ΟΡΙΣΜΟΙ, ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ, ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ, ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ, ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΕΚΤΑΣΕΙΣ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την κυρίαρχη αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως και κατατάσσονται σε αρκετές κατηγορίες όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα (π.χ. στεφανιαία νόσος, περιφερική αγγειακή νόσος, βαλβιδοπάθειες, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, καρδιακή ανεπάρκεια) [187]. Η έγκαιρη αναγνώριση των σημείων και συμπτωμάτων των καρδιαγγειακών νοσημάτων μπορεί να διευκολύνει την αναγνώριση των ατόμων σε κίνδυνο για νόσο και τη χορήγηση έγκαιρα της κατάλληλης θεραπείας, ωστόσο, η κλινική αξιολόγηση των ασθενών ή των ατόμων σε κίνδυνο είναι μια απαιτητική διαδικασία σε αρκετές περιπτώσεις [188]. Για το λόγο αυτό, έχουν γίνει προσπάθειες δημιουργίας εργαλείων, που ονομάζονται βιοδείκτες, οι οποίοι θα βοηθήσουν την αναγνώριση των ατόμων σε κίνδυνο για τη νόσο, στη διάγνωση των πασχόντων, στη διαφορική διάγνωση των νοσημάτων, στη καθοδήγηση της θεραπείας, στη σταδιοποίηση του κινδύνου και στην εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών [187]. Αρκετοί βιοδείκτες έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα με προέλευση από βιολογικά υλικά (πχ. πλάσμα, ορός, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, βιοψίες), και ως τέτοιοι δείκτες μπορούν να μετρηθούν πεπτίδια, πρωτείνες, προϊόντα του μεταβολισμού και γενετικό υλικό (μόρια DNA, RNA, διενέργεια καρυοτύπου) [189-191]. Επιπλέον, μπορεί να είναι είτε μοριακοί βιοδείκτες (πρωτείνες, γονίδια/καρυότυπος, χημικές ουσίες), είτε κυτταρικοί δείκτες, είτε απεικονιστικοί βιοδείκτες (όπως δείκτες προερχόμενοι από τις ακτινογραφίες, τη μαστογραφία, τους υπερήχους, τις διάφορες ενδοσκοπικές μεθόδους, την οπτική τομογραφία συνοχής, τη φασματοσκοπία υπερύθρου και την αξονική τομογραφία μεταξύ πολλών τεχνικών) [191-193].

Δύο είναι οι κυρίαρχες στρατηγικές που έχουν αναπτυχθεί με σκοπό τη μελέτη και την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών: η στοχευμένη μέθοδος, που δίνει τη δυνατότητα γνώσης περί της (παθο)φυσιολογίας της νόσου σε κάθε στάδιο της μελετώντας συγκεκριμένα μονοπάτια που εμπλέκονται με τη γένεση των νόσων, και η μη-στοχευμένη μέθοδος, που δίνει τη δυνατότητα ευρύτερης μελέτης μιας σειράς πιθανών βιοδεικτών από τα υλικά μελέτης όπως γίνεται με τη χρήση των τεχνικών -omics (proteomics, genomics, transcriptomics και metabolomics) [194, 195]. Η γενωμική αφορά τη μελέτη της δομής, της λειτουργίας του γονιδιώματος και της έκφρασής του, η πρωτεωμική αφορά τη μελέτη ολόκληρων πρωτεϊνών και πεπτιδίων και των σύνθετων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην έκφραση των πρωτεϊνών και τις περιβαλλοντικές επιδράσεις, η μεταγραφωμική μελετά τη λειτουργία των μεταγράφων του γενετικού υλικού και συγκεκριμένα των διάφορων RNA όπως τα mRNAs, τα non-coding RNAs, τα small RNAs (όπως τα microRNA-miRNA, τα small interfering RNA-siRNA και τα piwi-interacting RNA-piRNA) και τέλος η μεταβολωμική μελετά τις δράσεις μορίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό όπως τα παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων και συγκεκριμένα τα λιπίδια, πεπτίδια, αμινοξέα, νουκλεικά οξέα και οργανικά οξέα [194, 196-198].

Στην Καρδιολογία έχουν αξιολογηθεί διάφορες παράμετροι ως πιθανοί βιοδείκτες είτε μέσω αξιολόγησης βιολογικών υλικών (αίμα, ούρα) είτε με τη βοήθεια των απεικονιστικών τεχνικών και των διαγνωστικών εξετάσεων όπως η υπερηχοκαρδιογραφία, η μαγνητική τομογραφία, η αξονική τομογραφία, το σπινθηρογράφημα, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων, η στεφανιογραφία, η οπτική τομογραφία συνοχής, και αυτό καθώς οι απεικονιστικές εξετάσεις μετρούν ανατομικά, φυσιολογικά, μοριακά ή βιοχημικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη νόσο [199-204]. Ένας βιοδείκτης μπορεί να είναι ένα οποιοδήποτε χαρακτηριστικό είτε κλινικό (όπως η αρτηριακή πίεση και ο αρτηριακός παλμός) είτε μια παράμετρος που προκύπτει από τις πλέον σύνθετες εξετάσεις που

πραγματοποιούνται από ένα σύγχρονο διαγνωστικό εργαστήριο [205]. Η χρήση των βιοδεικτών αποσκοπεί στην πρωιμότερη αναγνώριση των ατόμων σε κίνδυνο για ένα νόσημα ώστε να προσφερθούν οι κατάλληλες συμβουλές για αλλαγή στον τρόπο ζωής ή για χορήγηση θεραπείας βάσει των ιατρικών ενδείξεων ενώ ο συνδυασμός τους με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα (όπως η αρτηριακή υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, το φύλο) μπορεί να διευκολύνει τη σταδιοποίηση του κινδύνου για μελλοντικά νοσήματα [206].

Οι βιοδείκτες κατέχουν σημαντική θέση στην έρευνα και έχουν βοηθήσει στον τομέα της φαρμακευτικής και των ιατρικών συσκευών [207]. Η αξιολόγηση ενός υποψήφιου βιοδείκτη ξεκινά από το εργαστήριο και τον έλεγχο σε προκλινικά μοντέλα νόσου και συνεχίζει με τη μελέτη σε ανθρώπους στις κλινικές δοκιμές [208]. Μάλιστα, η χρήση των βιοδεικτών είναι περισσότερο αντικειμενική από ότι τα ερωτηματολόγια ενώ ταυτόχρονα δίδεται η δυνατότητα μελέτης αρκετών παθοφυσιολογικών μονοπατιών [190]. Ένας βιοδείκτης αποτελεί σύμφωνα με τους περισσότερους ορισμούς ένα χαρακτηριστικό που είναι μετρήσιμο με αντικειμενικό τρόπο και που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση ενός τελικού αποτελέσματος που διερευνάται [200]. Ένας βιοδείκτης μπορεί να αφορά επιπλέον ένα ενδιάμεσο στάδιο/δείκτη (surrogate endpoint) μιας έκβασης, ωστόσο, αυτή η κατάσταση προϋποθέτει την παρουσία συσχέτισης του βιοδείκτη με την υπό μελέτη έκβαση και την μεταβολή του βιοδείκτη με αντίστοιχο τρόπο με τη μεταβολή της έκβασης, παρότι αυτό δεν υποδηλώνει πάντα την παρουσία αιτιολογικής σχέσης [199]. Η στρατηγική αυτή διευκολύνει τη διενέργεια των κλινικών μελετών καθώς η χρήση ενός κατάλληλου βιοδείκτη δίνει την ευκαιρία να μειωθεί ο απαιτούμενος αριθμός ατόμων, να διερευνηθούν παράμετροι όπως το κόστος-όφελος πιθανών θεραπειών και η προσέγγιση της εξατομικευμένης ιατρικής [209]. Οι βιοδείκτες διαφέρουν από την κλινική έκβαση ή τα συμπτώματα που διερευνούν και μπορεί να χρησιμοποιούνται για περισσότερους από έναν σκοπούς [199]. Παρόλα αυτά, στην ιατρική το ενδιαφέρον των μελετών επικεντρώνεται στη μέτρηση μιας κλινικής έκβασης ή ενός συμπτώματος [200]. Συνεπώς, η αξία των βιοδεικτών αντανακλάται όταν μπορούν να βοηθήσουν στις αποφάσεις σχετικά με θέματα υγείας πέραν των γνωστών κλινικών πληροφοριών [199]. Αν και συνήθως απασχολεί η κλινική έκβαση ενός ατόμου, αυτή μπορεί να μη σχετίζεται πάντα με τις τιμές ενός βιοδείκτη και το αντίστροφο [210]. Για το λόγο αυτό, οι βιοδείκτες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και να αξιολογούνται με προσοχή [210].

Ένας βιοδείκτης σχετίζεται παθοφυσιολογικά με το νόσημα που μελετάται όπως για παράδειγμα με τα μοριακά ή ιστολογικά χαρακτηριστικά και κατά αυτόν τον τρόπο προσεγγίζει την κατανόηση ενός μελετώμενου φαινομένου [200]. Ένας βιοδείκτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσυμπτωματικό έλεγχο ενός νοσήματος, στη διάγνωση και να διευκολύνει την επιμέρους ταξινόμησή/κατηγοριοποίηση ενός νοσήματος [199]. Ειδικά για την πρόγνωση ή τον προσυμπτωματικό έλεγχο θα πρέπει να υπάρχουν συγκεκριμένα όρια αναφοράς ώστε να έχει όφελος για κλινική χρήση [211]. Παράλληλα, μπορεί να βοηθήσει στην παρακολούθηση ασθενών με κάποιο νόσημα και στην καθοδήγηση της θεραπείας [199]. Ακόμη, μπορεί να βοηθήσει στην ανάδειξη του κινδύνου για μελλοντικά συμβάματα, ή τοξικότητας εκτιμώμενος πριν και μετά από μια θεραπεία ή να δώσει πληροφορίες σχετικά με παραμέτρους φαρμακοδυναμικής (βιοδείκτης απαντητικότητας σε θεραπείες) [199, 200]. Ωστόσο θα πρέπει να πληρούνται ορισμένα κριτήρια ώστε να μπορεί να λάβει έγκριση για χρήση [199]. Οι διεθνείς οργανισμοί καρδιολογίας όπως ο American Heart Association (AHA) έχουν ορίσει τα κριτήρια αυτά και τη διαδικασία στην οποία θα πρέπει να υποβάλλεται ένας νέος βιοδείκτης ώστε να κριθεί κατάλληλος για κλινική χρήση [212]. Συγκεκριμένα, θα πρέπει να έχει τεκμηριωμένη αξιοπιστία για έναν συγκεκριμένο πληθυσμό, δηλαδή να μετράται με ακρίβεια και πιστότητα, και εξωτερική εγκυρότητα για ευρύτερους πληθυσμούς [210]. Θα πρέπει να ελεγχθεί η επιπρόσθετη αξία της μέτρησής

του πέραν των γνωστών δεικτών κινδύνου, να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητά του στη διαχείριση των ασθενών και στις εκβάσεις τους και να αξιολογηθεί η σχέση κόστους-αποτελέσματος (cost-benefit) [212]. Είναι σημαντικό να υπάρχει επικυρωμένη (validated) μέθοδος προσδιορισμού του βιοδείκτη ώστε να μετράται με ακρίβεια (που αντανάκλα την απόσταση της μετρούμενης τιμής από την πραγματική) και πιστότητα (που μετράται με την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των μετρήσεων) μεταξύ των εργαστηρίων, να έχει χαμηλό κόστος, μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, να είναι σταθερός ως μόριο και ειδικά εάν πρόκειται για τη διάγνωση ενός νοσήματος να μην εντοπίζεται σε άλλους ιστούς πλην του μελετώμενου ή σε υγιείς ανθρώπους [199, 204]. Η μέτρησή του με μια αναλυτική τεχνική θα πρέπει να είναι εύκολη και να υπάρχει μικρή μεταβλητότητα μεταξύ των μετρήσεων του ίδιου ατόμου [213]. Σχετικά με τα όρια αναφοράς, θα πρέπει να είναι συγκεκριμένα, αν και αυτά μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται [214, 215]. Η τεκμηρίωση των ορίων αναφοράς θα πρέπει να γίνεται σε υγιή άτομα και σε πάσχοντες, επιπλέον, θα πρέπει να ελέγχονται διαφορές ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, την εθνικότητα, την παρουσία νόσου και να ελέγχονται τυχόν μεταβολές του βιοδείκτη σε σχέση με τους παράγοντες κινδύνου [216]. Συνήθως, τα χρησιμοποιούμενα κατώφλια για τον καθορισμό του παθολογικού από το φυσιολογικό ορίζονται ως το 95% του διαστήματος αναφοράς (δηλαδή ανάμεσα στην τιμή που αντιστοιχεί στην 2.5% και την 97.5% θέση), παρόλα αυτά, το όριο ποικίλει ανάλογα με κάθε τεστ και κατά συνέπεια το όριο για τον καθορισμό των ψευδώς θετικών ή αρνητικών [217]. Παρόλα αυτά, δεν αποκλείεται ένα άτομο να είναι υγιές και να αποκτήσει τιμή εκτός των φυσιολογικών ορίων και το αντίστροφο, γεγονός που αντανάκλα διαφορές στην προέλευση των ατόμων σε σχέση με τον πληθυσμό από τον οποίο καθορίστηκαν τα όρια αναφοράς [204]. Αρκετοί βιοδείκτες των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι συνεχείς μεταβλητές και ακολουθούν την κανονική κατανομή, ωστόσο, σημειώνονται και εξαιρέσεις [218].

Ένας βιοδείκτης θα πρέπει να σχετίζεται με την έκβαση που μελετάται με στατιστικά σημαντικό τρόπο, παρόλα αυτά, η ύπαρξη στατιστικής σημαντικότητας δεν υποδηλώνει πάντα την παρουσία αιτιολογικής σχέσης ή κλινικής σημαντικότητας [219]. Σημαντική θέση στην αξιολόγηση των χαρακτηριστικών απόδοσης ενός βιοδείκτη έχουν οι καμπύλες ROC (receiver-operating characteristic curves) που απεικονίζουν το λόγο της ευαισθησίας προς 1-ειδικότητα από τις οποίες αξιολογείται το εμβαδό κάτω από την καμπύλη, που δείχνει την πιθανότητα ενός θετικού τεστ σε έναν ασθενή από ενός τυχαίου μη πάσχοντος ατόμου [218, 220]. Η χρήση της ευαισθησίας και της ειδικότητας δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού του πηλίκου πιθανοτήτων που εκφράζουν την πιθανότητα να υπάρχει θετικό τεστ σε κάποιο πάσχοντα αντί ενός υγιούς ατόμου και την πιθανότητα να υπάρχει ένα αρνητικό τεστ σε κάποιον με τη νόσο σε σχέση με κάποιον χωρίς τη νόσο [211]. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία αφορά την δυνατότητα του βιοδείκτη να αναδείξει τη νόσο ή μια υπό μελέτη κατάσταση όταν αυτή υπάρχει (όπως για παράδειγμα την πιθανότητα ενός θετικού τεστ σε ένα άτομο που νοσεί) και η ειδικότητα αναφέρεται στην ικανότητα ενός βιοδείκτη να αποκλείει τη νόσο ή μια κλινική κατάσταση που μελετάται (πχ. η πιθανότητα ενός αρνητικού τεστ σε ένα άτομο που δεν έχει τη νόσο) [204]. Παραπλήσιας αρχής με την καμπύλη ROC είναι η χρήση του δείκτη συμφωνίας (c statistic, concordance index), που αξιολογεί την πιθανότητα ένα θετικό τεστ να ανιχνεύει ορθά τη νόσο ελέγχοντας δύο τυχαία ζεύγη ατόμων από τα οποία ένα έχει και το άλλο δεν έχει τη νόσο [204]. Ένα άλλο χρήσιμο τεστ είναι το τεστ Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit το οποίο αντανάκλα την ικανότητα του βιοδείκτη (είτε μόνου είτε στα πλαίσια ενός πολυπαραγοντικού μοντέλου) να προβλέπει τον κίνδυνο για μια νόσο (βαθμονόμηση, calibration) συγκρίνοντας τον παρατηρούμενο με τον αναμενόμενο κίνδυνο για κάθε δεκαδικό επίπεδο κινδύνου ενός πληθυσμού [221].

Όταν πρόκειται για τη διάγνωση μιας απειλητικής για τη ζωή νόσου σε συμπτωματικό άτομο (π.χ. έμφραγμα του μυοκαρδίου) απαιτείται μεγάλη ευαισθησία καθώς η απώλεια της διάγνωσης σε έναν αληθινά πάσχοντα θα επιφέρει δυσμενείς συνέπειες για το άτομο (στρατηγική “rule out”, αποκλεισμού) [222]. Από την άλλη, για τον έλεγχο παρουσίας μιας μη συχνής νόσου σε ασυμπτωματικό άτομο θα πρέπει να υπάρχει υψηλή ειδικότητα (κανόνας “rule in”, επιβεβαίωσης της διάγνωσης) αφού οι συνέπειες από την ψευδή διάγνωση είναι μεγαλύτερες για το άτομο [222]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο επιπολασμός του υπό μελέτη νοσήματος είναι σημαντική παράμετρος για την αξιολόγηση του αποτελέσματος καθώς ακόμη και εάν υπάρχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, σε ένα νόσημα με χαμηλό επιπολασμό θα προκύψουν περισσότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα από τα αληθώς θετικά τεστ, και σε ένα νόσημα με μεγάλο επιπολασμό θα προκύψουν περισσότερα ψευδώς αρνητικά από αληθώς αρνητικά αποτελέσματα [223]. Για τον προσυμπτωματικό έλεγχο και τη διάγνωση μιας νόσου απαιτείται υψηλή ευαισθησία, υψηλή ειδικότητα και χαμηλό κόστος, ενώ για την παρακολούθηση της εξέλιξης μιας νόσου ή της απάντησης σε μια θεραπεία είναι περισσότερο σημαντικό να μην υπάρχει μεταβλητότητα μεταξύ των διαδοχικών μετρήσεων του βιοδείκτη, και τα επίπεδα του βιοδείκτη να συμπορεύονται με τις αλλαγές στην κλινική εικόνα, ενώ για την πρόγνωση ενός νοσήματος το κόστος είναι λιγότερο σημαντικό καθώς ελέγχονται άτομα που ήδη έχουν τη νόσο [224]. Τέλος, η εκτίμηση της προγνωστικής ικανότητας ενός βιοδείκτη απαιτεί τη μελέτη σε μεγαλύτερο πληθυσμό και χρειάζεται μελέτη με προοπτικό σχεδιασμό ενώ από την άλλη η χρήση ενός βιοδείκτη για τη διάγνωση μιας νόσου μπορεί να γίνει με μικρότερο πληθυσμό και με διαχρονικό σχεδιασμό [225].

Διάφορες στρατηγικές αξιολόγησης πολλαπλών βιοδεικτών ταυτόχρονα (ως πάνελ βιοδεικτών) έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα ερευνητικά και στοχεύουν στην υποβοήθηση της εξατομικευμένης διάγνωσης, θεραπείας και πρόγνωσης των ασθενών [226]. Ειδικά για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η πρόγνωση του καρδιαγγειακού κινδύνου ενός ατόμου στηρίζεται στην αξιολόγηση των συνήθων παραγόντων κινδύνου όπως η δυσλιπιδαιμία, η αρτηριακή υπέρταση, το κάπνισμα, το ιστορικό σακχαρώδους διαβήτη, η ηλικία και το φύλο [227]. Λόγω της σύνθετης παθοφυσιολογίας των καρδιαγγειακών νοσημάτων, οι βιοδείκτες μπορούν να αντισταθμίζουν πληροφορίες για μονοπάτια που εμπλέκονται στη γένεση των νοσημάτων της καρδιάς όπως η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες, η απόπτωση, τα νευροορμονικά συστήματα, γενετικοί δείκτες και πολυμορφισμοί [226, 228]. Ωστόσο, ελάχιστοι βιοδείκτες έχουν δείξει μεγαλύτερη προγνωστική ικανότητα αλλά και ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα σε σχέση με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα [229]. Σε κάθε περίπτωση, η επιπλέον αξία ενός βιοδείκτη θα πρέπει να αξιολογείται από την ανίχνευση ύπαρξης αυξημένου κινδύνου για ένα άτομο από αυξημένες τιμές του βιοδείκτη σε σχέση με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου, που ελέγχονται με την εκτίμηση του σχετικού κινδύνου και τη μελέτη σε πολυπαραγοντικά μοντέλα [230]. Η παρουσία ενός σκορ που συνυπολογίζει αρκετούς παράγοντες κινδύνου είναι χρήσιμη, καθώς μπορούν να εκτιμήσουν με συνεργιστικό τρόπο τον κίνδυνο από ότι μεμονωμένοι παράγοντες κινδύνου [231]. Παρομοίως, τέτοια σκορ υπολογισμού του κινδύνου θα πρέπει να είναι γενικεύσιμα σε αντίστοιχο πληθυσμό, σε ευρύτερους γεωγραφικά πληθυσμούς με κοινά χαρακτηριστικά και σε ευρύτερους πληθυσμούς ασθενών, και να βαθμονομούνται ανάλογα με το εάν αλλάζουν τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού [221]. Ορισμένοι βιοδείκτες που δεν προσδίδουν επιπλέον αξία σε σχέση με τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου μπορούν να μετρώνται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε ασθενείς με θετικό οικογενειακό ιστορικό για πρώιμη στεφανιαία νόσο και παράγοντες κινδύνου που δεν έχουν συμπτώματα, ή σε ασθενείς με θετικό οικογενειακό ιστορικό ή σε ασθενείς με υποτροπή της νόσου παρά την βέλτιστη ρύθμιση των παραγόντων κινδύνου [231].

Η μέτρηση ενός βιοδείκτη θα πρέπει να ακολουθεί μια τυποποιημένη και κοινά αποδεκτή προ-αναλυτική αξιολόγηση (πχ. τυποποιημένη διαδικασία συλλογής και αποθήκευσης ενός δείγματος από το οποίο θα αναλυθεί ένας βιοδείκτης, δηλαδή ενός συγκεκριμένου πρωτοκόλλου εργασίας) [190]. Εν συνεχεία, θα πρέπει να εξασφαλίζεται η τυποποίηση των αναλυτικών διαδικασιών κατά τη μέτρησή του και συγκεκριμένα, να ακολουθούνται οι ενδεικνυόμενες οδηγίες και μεθοδολογίες προσδιορισμού του στη βάση κάποιας αναλυτικής τεχνικής αλλά και να εξασφαλίζονται τα κριτήρια του εσωτερικού, ποιοτικού ελέγχου από την πλευρά των εργαστηρίων [232]. Οι μέθοδοι προσδιορισμού του σύμφωνα με την αναλυτική μέθοδο που ακολουθείται κάθε φορά θα πρέπει να είναι τυποποιημένες όπως επίσης και για τα πρότυπα υλικά που χρησιμοποιούνται, ώστε να εξασφαλισθεί μικρή αναλυτική μεταβλητότητα και κατά συνέπεια να διασφαλισθεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, που υποδηλώνει την προσέγγιση του αποτελέσματος της μεθόδου προς την αληθινή τιμή [233]. Είναι σημαντικό να υπάρχουν σαφή όρια ανίχνευσης για ένα βιοδείκτη (που αποτυπώνουν την πιο μικρή ποσότητα του βιοδείκτη που μπορεί να ανιχνευθεί σε σχέση με το θόρυβο) και σαφή όρια ποσοτικοποίησης (που αντανακλούν τη μικρότερη ποσότητα βιοδείκτη που μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα δείγμα με αποδεκτή ακρίβεια και πιστότητα υπό τις συνθήκες της ανάλυσης) [204]. Είναι σημαντικό να διασφαλισθεί η πιστότητα των μετρήσεων, που υποδηλώνει την συνέπεια μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων μιας αναλυτικής τεχνικής και εκτιμάται με διάφορους τρόπους όπως με το συντελεστή μεταβλητότητας ή το συντελεστή συμφωνίας kappa [234]. Όταν η αναλυτική μεταβλητότητα είναι μεγαλύτερη από τη βιολογική μεταβλητότητα τότε η ανάλυση θα πρέπει να επαλαμβάνεται εις διπλούν σύμφωνα με τη μεθοδολογία του εργαστηρίου, ενώ όταν η βιολογική μεταβλητότητα του βιοδείκτη είναι μεγαλύτερη από την εργαστηριακή μεταβλητότητα τότε θα πρέπει να μετράται σε περισσότερες από μια περιστάσεις. Παρόλα αυτά, η βιολογική μεταβλητότητα θα πρέπει να περιορίζεται, όπου μπορεί να γίνει, με εφαρμογή κατάλληλου πρωτοκόλλου εργασίας (λαμβάνοντας υπόψη τις παραμέτρους που καθορίζουν την εγγενή μεταβλητότητα- πχ.λήψη αίματος υπό συγκεκριμένες ημέρες/ώρες κάθε φορά, αλλά και τη μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών ατόμων) [204]. Ομοίως, κανόνες ποιοτικού ελέγχου και τυποποίησης των μεθοδολογιών υπάρχουν και για άλλους βιοδείκτες όπως οι απεικονιστικοί και οι γενετικοί δείκτες [235, 236]. Τέλος, εξίσου σημαντική στην εργαστηριακή πρακτική είναι η ύπαρξη ενός συγκεκριμένου πρωτοκόλλου αναφοράς και παρουσίας των αποτελεσμάτων των μετρήσεων με προκαθορισμένα κριτήρια ποιότητας [237].

Μια σύγχρονη ερευνητική προσέγγιση είναι η χρήση των «μεγάλων δεδομένων», όπου αξιολογούνται με τη βοήθεια αλγορίθμων μηχανικής μάθησης (machine learning) και χρήσης ηλεκτρονικών υπολογιστών αρκετές και διαφορετικές πηγές δεδομένων και λαμβάνονται συμπεράσματα σχετικά με τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία των ασθενών [238]. Σύμφωνα με τους αλγορίθμους της μηχανικής μάθησης μελετώνται μοτίβα που απορρέουν από διάφορες πηγές δεδομένων αντί συγκεκριμένων μεταβλητών και γίνονται συσχετίσεις μεταξύ τους ώστε να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα [238]. Το πεδίο της τεχνητής νοημοσύνης (artificial intelligence) εξελίσσεται ολοένα και περισσότερο στον τομέα της καρδιολογίας όπως και σε άλλες επιστήμες με απώτερο σκοπό την καλύτερη παροχή φροντίδας προς τους ασθενείς και την καλύτερη διαχείριση του κόστους χρησιμοποιώντας ως πηγές πέρα από τα ηλεκτρονικά αρχεία καταγραφής των ασθενών και άλλα διοικητικά έγγραφα, δεδομένα από τις ηλεκτρονικές συσκευές και κινητά, βιοανιχνευτές, απεικονιστικές εξετάσεις και περιβαλλοντικά δεδομένα [238, 239]. Νέες προεκτάσεις στον τομέα της έρευνας έχουν δοθεί με τη χρήση των σύγχρονων συσκευών καταγραφής (όπως τα έξυπνα κινητά, τα ρολόγια) που είναι σε θέση να εκτιμήσουν παραμέτρους που σχετίζονται με τον καθημερινό τρόπο ζωής των ατόμων και αποθήκευσης πληθώρας δεδομένων [240].

Η συναξιολόγηση γενετικών, πρωτεωμικών και μεταβολομικών δεικτών πέρα από τα κλινικά δεδομένα είναι ένας απώτερος ερευνητικός σκοπός για να εξυπηρετηθεί η ανάγκη για καλύτερη και ακριβέστερη διάγνωση σύνθετων φαινοτυπικών και κλινικών εκδηλώσεων ώστε να υπάρχει εξατομικευμένη αντιμετώπιση των πασχόντων [239]. Άλλωστε, η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, η μελέτη των πολυμορφισμών, η χρήση των μικροσυστοιχιών, της πρωτεωμικής και της νανοτεχνολογίας έχουν δώσει προεκτάσεις για τη μελέτη πιθανών βιοδεικτών στο καρδιαγγειακό σύστημα καθώς επίσης και η εξέλιξη των μεθοδολογιών υπολογισμού τους [241, 242]. Παρόλα αυτά, δεν θα πρέπει να λησμονείται ότι οι περισσότεροι ασθενείς στην καθημερινή πραγματικότητα έχουν πολλαπλά ιατρικά προβλήματα, μεγαλύτερη ηλικία και λαμβάνουν αγωγές που αποκλίνουν από τα αυστηρά κριτήρια των κλινικών μελετών, με συνέπεια η εκτίμηση των βιοδεικτών να πρέπει να γίνεται με προσοχή και με κριτική σκέψη [228]. Ειδικά για τους γενετικούς βιοδείκτες θα πρέπει να εξασφαλιστεί η τήρηση των αρχών της βιοηθικής καθώς η κοινοποίηση πληροφοριών τέτοιας φύσης θέτει προβληματισμούς περί της ασφάλειας των προσωπικών δεδομένων των ατόμων ή των πασχόντων και περί γένεσης ανισοτήτων και διακρίσεων σε διάφορους τομείς της ζωής (πχ. εργασία) [243, 244]. Η παρουσία ενός ψευδώς θετικού γενετικού τεστ αποτελεί σημαντική ανησυχία στον τομέα των βιοδεικτών και ένα τέτοιο αποτέλεσμα θα πρέπει να ελέγχεται σε ανεξάρτητα δείγματα, λαμβάνοντας υπόψη την πιθανότητα για μια νόσο (pre-test probability) [245].

Συμπερασματικά, η χρήση των βιοδεικτών μπορεί να βοηθήσει στο πεδίο της διαγνωστικής, της έρευνας, της θεραπευτικής, της πρόγνωσης και να διευκολύνει τον έλεγχο του κόστους, ωστόσο, θα πρέπει να πληρούνται προϋποθέσεις όπως η χρήση τους στη βάση συγκεκριμένων ενδείξεων, η τυποποίηση των εργαστηριακών μεθόδων, η τεκμηρίωση των χαρακτηριστικών απόδοσης τους και τέλος η αξιολόγηση της επιπρόσθετης κλινικής αξίας από τη χρήση τους σε σχέση με τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου [204, 210]. Στην πράξη, η επιλογή ενός βιοδείκτη γίνεται ανάλογα με το κλινικό σενάριο που διερευνάται, τη δομή υγείας όπου γίνεται η αξιολόγηση (τμήμα επειγόντων, ιατρείο), τη χρονική σχέση ανάμεσα στην έναρξη των συμπτωμάτων και της μέτρησης του βιοδείκτη, αναλυτικές παραμέτρους σχετικές με τη χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία και το σκοπό για τον οποίο γίνεται η αξιολόγηση του βιοδείκτη (διάγνωση, πρόγνωση) [246]. Είναι ιδιαίτερα σημαντική η συνεργασία αρκετών επιστημονικών πεδίων για την ανάπτυξη και αξιολόγηση νέων πιθανών βιοδεικτών όπως οι κλάδοι της Βιολογίας, της Χημείας, της Φυσικής, της Ιατρικής, της Βιοπληροφορικής και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη η υιοθέτηση μιας στρατηγικής βιολογίας συστημάτων που μελετά πολλαπλά στοιχεία ενός συστήματος και τα εξωτερικά του στοιχεία όπως περιβαλλοντικές επιδράσεις [247]. Άλλωστε, η γνώση περί των βιοδεικτών μεταβάλλεται διαρκώς λόγω των εξελίξεων στην επιστήμη και την έρευνα και για το λόγο αυτό αποτελεί ένα επίκαιρο θέμα το οποίο έχει ευρείες προεκτάσεις όχι μόνο για το άτομο αλλά και την κοινωνία γενικότερα [190]. Απώτερη φιλοδοξία στον τομέα της έρευνας είναι η δυνατότητα λήψης χρήσιμων διαγνωστικών και προγνωστικών πληροφοριών με τη βοήθεια των προηγμένων απεικονιστικών μοριακών τεχνικών ανάλυσης, που προσφέρουν πληροφορία ως προς το «χρόνο και χώρο», μαζί με την ταυτόχρονη αξιολόγηση πληροφοριών από γνωστές τεχνικές ανάλυσης (4D-based spatial omics)[248].

3. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Όπως συζητήθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, μια σειρά κλινικών και ερευνητικών δεδομένων έχουν προκύψει από τη χρήση απεικονιστικών τεχνικών του καρδιαγγειακού συστήματος, που μετρούν δείκτες οι οποίοι σχετίζονται με τις παθοφυσιολογικές διαδικασίες που εμπλέκονται στην καρδιαγγειακή νόσο [249]. Επιγραμματικά, στο σημείο αυτό θα γίνει αναφορά στις σημαντικότερες απεικονιστικές εξετάσεις του καρδιαγγειακού συστήματος και στους δείκτες που χρησιμοποιούνται με τη βοήθεια αυτών για διαγνωστικούς, προγνωστικούς, θεραπευτικούς και ερευνητικούς σκοπούς.

Μια από τις σημαντικότερες εξετάσεις του καρδιαγγειακού συστήματος είναι η υπερηχοκαρδιογραφία (διαθωρακική ή διοισοφάγιος μελέτη) στην οποία εξετάζονται σε πραγματικό χρόνο και με συγκεκριμένη μεθοδολογία και ακολουθίες (π.χ. μελέτη Doppler, χρήση λογισμικών 2D και 3D) οι διαστάσεις των καρδιακών κοιλοτήτων (κόλποι, κοιλίες, μεγάλα αγγεία, περικάρδιο), η κινητικότητα των μυοκαρδιακών ιστών, η αιματική ροή και εκτιμώνται αιμοδυναμικές παράμετροι δίνοντας τη δυνατότητα να εξετασθούν σύνθετες δομές όπως οι βαλβίδες, οι επιμέρους μυοκαρδιακές κοιλότητες, η μυοκαρδιακή συσπαστικότητα και η διαστολική λειτουργία του μυοκαρδίου με μη-επεμβατικό τρόπο και σε πραγματικό χρόνο σε μια ποικιλία νοσημάτων και καταστάσεων όπως η στεφανιαία νόσος, οι μυοκαρδιοπάθειες, η καρδιακή ανεπάρκεια, οι βαλβιδοπάθειες και συστηματικά νοσήματα ενώ επιπλέον διευκολύνεται ο προεπεμβατικός έλεγχος και η αξιολόγηση των ασθενών (πχ. αντιμετώπιση βαλβιδοπαθειών, ενδοκαρδιακών επικοινωνιών κοκ) [250, 251]. Δε θα πρέπει να λησμονούνται οι πληροφορίες που λαμβάνονται από το ηλεκτροκαρδιογράφημα, μια από τις θεμελιώδεις εξετάσεις του καρδιαγγειακού συστήματος, το οποίο διευκολύνει την παρακολούθηση του καρδιακού ρυθμού, ανιχνεύει τις αρρυθμίες, την ισχαιμία και δομικές διαταραχές των μυοκαρδιακών κοιλοτήτων (πχ. υπερτροφία κόλπων, κοιλιών) που έχουν διαγνωστική και προγνωστική ικανότητα, ενώ από την άλλη, δίδεται η ευκαιρία τηλεμετρίας και μακρόχρονης καταγραφής του ρυθμού όπως με τη συσκευή Holter αλλά και ενδοκαρδιακά τοποθετούμενων συσκευών ελέγχου του ρυθμού [252]. Ακόμη, σημαντικές πληροφορίες λαμβάνονται από την εκτίμηση της πάχυνσης του ενδοθηλίου στις καρωτίδες (carotid intima-media thickness), που αξιολογείται στην έσω καρωτίδα ή την κοινή καρωτίδα και έχει παρουσιάσει συσχέτιση με τον κίνδυνο για ανάπτυξη αθηρωματικής νόσου και καρδιαγγειακών συμβαμάτων, ωστόσο χρησιμοποιείται κυρίως ερευνητικά [253].

Με την αξονική στεφανιογραφία αξιολογούνται με μη-επεμβατικό τρόπο δομικά χαρακτηριστικά της καρδιάς, ελέγχεται η παρουσία στενώσεων των επικαρδιακών στεφανιαίων αγγείων σε άτομα με χαμηλή προς ενδιάμεση πιθανότητα στεφανιαίας νόσου, αξιολογείται το μέγεθος των καρδιακών κοιλοτήτων και η λειτουργικότητά τους και υπολογίζεται το σκορ ασβεστίου, το οποίο έχει προγνωστική αξία για μελλοντικά καρδιαγγειακά επεισόδια ενώ ταυτόχρονα συμμετέχει στη λήψη αποφάσεων για συγκεκριμένα νοσήματα [254, 255]. Υπάρχει η δυνατότητα με κατάλληλο λογισμικό να αξιολογηθεί το περιαγγειακό λίπος των στεφανιαίων αγγείων, το οποίο έχει μεταβολικά ενεργό ρόλο και εμπλέκεται με την αθηρογένεση και τις διαδικασίες της φλεγμονής [256]. Ωστόσο, για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου καταλληλότερη είναι η στεφανιογραφία, η οποία είναι επεμβατική τεχνική και αποτελεί την εξέταση εκλογής [257]. Στα πλαίσια του καρδιακού καθετηριασμού είναι δυνατό να εκτιμηθούν με ακρίβεια αιμοδυναμικοί δείκτες όπως οι ενδοκαρδιακές πιέσεις, η στεφανιαία εφεδρεία, η δυσλειτουργία της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία με τη χορήγηση αγγειοδραστικών ουσιών, που έχουν προγνωστική αξία για τους ασθενείς με μη αποφρακτική στεφανιαία νόσο [258].

Από την άλλη πλευρά, σημαντικές πληροφορίες λαμβάνονται με τη βοήθεια των απεικονιστικών εξετάσεων της πυρηνικής ιατρικής όπως η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων και το σπινθηρογράφημα του μυοκαρδίου. Χαρακτηριστικά, με την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων γίνεται χορήγηση 18-φθοριο-δεοξυγλυκόζης ως ιχνηθέτη και σε σύζευξη με τις εικόνες της ακονικής τομογραφίας (PET-CT), μπορεί να αναγνωρισθεί το βιώσιμο από το μη-βιώσιμο μυοκάρδιο, να υποβοηθηθεί η διάγνωση της ενδοκαρδίτιδας των καρδιακών βαλβίδων, να αναγνωρισθεί η παρουσία λοίμωξης προσθετικών συσκευών αλλά και η παρουσία φλεγμονής που χαρακτηρίζει συγκεκριμένες κλινικές καταστάσεις που προσβάλουν το μυοκάρδιο (πχ. σαρκοείδωση) [259, 260]. Σε αυτό έχει βοηθήσει η εξέλιξη στις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων που χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες με συνέπεια τη δυνατότητα αναγνώρισης δομικών και λειτουργικών παραμέτρων των μυοκαρδιακών ιστών [261]. Παράλληλα, με το σπινθηρογράφημα αιμάτωσης του μυοκαρδίου με θάλλιο ή τεχνήτιο είναι δυνατόν να απεικονισθεί τμηματικά ή συνολικά η μυοκαρδιακή βιωσιμότητα, να αναδειχθούν περιοχές με ισχαιμία και ποιοι ασθενείς θα έχουν όφελος από πιθανή επέμβαση επαναγγείωσης με εφαρμογή πρωτοκόλλων που εξετάζουν τον υποψήφιο σε ηρεμία και σε κόπωση (φαρμακευτική ή μετά από άσκηση), γεγονός που έχει όφελος σε ασθενείς όπως οι διαβητικοί που συχνά δεν παρουσιάζουν συμπτώματα ισχαιμίας [259, 262, 263].

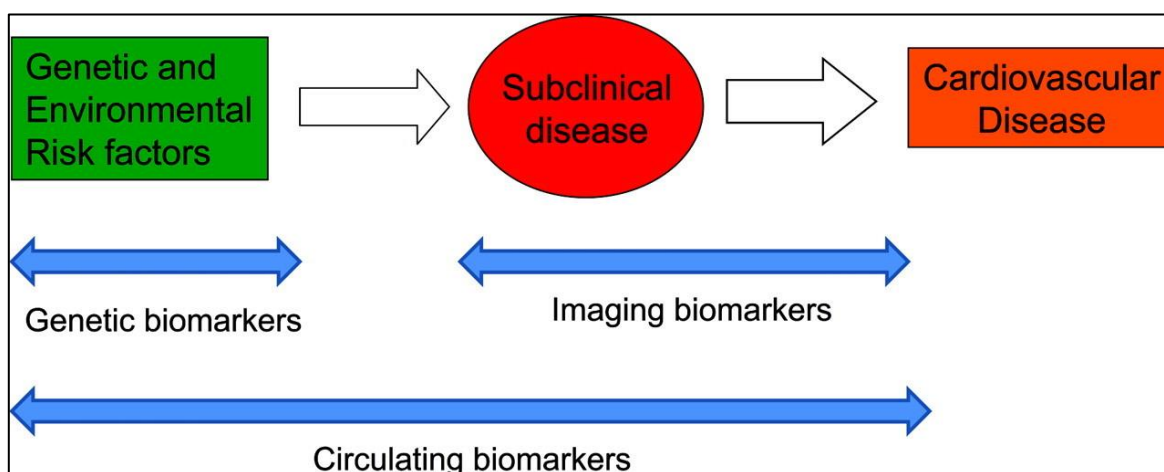
Η δυναμική ηχοκαρδιογραφία (stress echocardiography) είναι μελέτη που εξετάζει μέσω της κόπωσης με φαρμακευτικά μέσα ή άσκησης την παρουσία τμηματικών διαταραχών στη συσπαστικότητα του μυοκαρδίου και της συνολικής μυοκαρδιακής λειτουργίας, την παρουσία βιώσιμου μυοκαρδίου ή ουλής, επιπλέον, μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την αιμάτωση του μυοκαρδίου (πχ. ανάδειξη πάσχοντος αγγείου επί στεφανιαίας νόσου) με παραπλήσια ευασθησία και ειδικότητα με τις τεχνικές της πυρηνικής ιατρικής στις περισσότερες περιπτώσεις, με χαμηλότερο κόστος και χωρίς έκθεση σε ακτινοβολία [264-266]. Ακόμη, με ειδικά πρωτόκολλα μπορεί να αξιολογηθεί η βαλβιδική λειτουργία και να ληφθούν αποφάσεις σχετικά με την αναγκαιότητα διενέργειας επεμβατικών θεραπειών, μπορεί να ανιχνευθεί η παρουσία διαστολικής δυσλειτουργίας στην καρδιακή ανεπάρκεια με διατηρημένο κλάσμα εξώθησης ενώ νέες προεκτάσεις έχει δώσει η ανάπτυξη 3D λογισμικών και παραγόντων ηχοαντίθεσης [264, 267, 268]. Στις σημαντικότερες απεικονιστικές τεχνικές ανήκει η μαγνητική τομογραφία του μυοκαρδίου από την οποία μπορούν να ληφθούν πληροφορίες με μη-επεμβατικό τρόπο σχετικά με δομικές και λειτουργικές παραμέτρους του μυοκαρδίου και των μεγάλων αγγείων [249]. Συγκεκριμένα, μπορούν να ελεγχθούν η στεφανιαία μικροκυκλοφορία, η ιστική σύσταση του μυοκαρδίου (που δίνει τη δυνατότητα αξιολόγησης για διάφορα νοσήματα όπως οι μυοκαρδιοπάθειες), να εκτιμηθούν αιμοδυναμικές παράμετροι, η μυοκαρδιακή αιμάτωση, ο μεταβολισμός και παράμετροι σχετιζόμενες με τη λειτουργία των βαλβίδων [269]. Ιδιαίτερα βοηθητική είναι η χορήγηση παραμαγνητικών ουσιών όπως το γαδολίνιο καθώς ως ουσία που αθροίζεται εξωκυττάρια μπορεί να αναδείξει συγκεκριμένα μοτίβα που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους φαινοτύπους μυοκαρδιακής νόσου (πρότυπα οιδήματος, ίνωσης, διήθησης ξένου ιστού) [270]. Ακόμη, μπορεί να διευκολυνθεί η διαφορική διάγνωση μυοκαρδιακών μαζών, και να σταδιοποιηθεί ο αρρυθμολογικός κίνδυνος σε μυοκαρδιοπάθειες (όπως η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια) [270].

Κλείνοντας, ορισμένες εξετάσεις μπορούν να αξιολογήσουν τον κίνδυνο των ατόμων για καρδιαγγειακή νόσο εκτιμώντας τις λειτουργικές ιδιότητες των αγγείων καθώς η ανάπτυξη αγγειακής δυσλειτουργίας αποτελεί πρωταρχικό στάδιο της αθηρωματικής νόσου προτού αναπτυχθούν ορατές αγγειακές βλάβες [271]. Υπογραμμίζεται η εκτίμηση της ενδοθηλιακής λειτουργίας (που μπορεί να γίνει επεμβατικά και μη-επεμβατικά σε μια σειρά αγγειακών δικτύων όπως της στεφανιαίας κυκλοφορίας και των περιφερικών αγγείων) και της αρτηριακής σκληρίας (που αντανakλά την παρουσία δομικών αλλοιώσεων

στο τοίχωμα των αγγείων με κυρίαρχη τη μείωση της ελαστικής και την αύξηση του κολλαγόνου, η οποία επιταχύνεται υπό τη δράση των παραγόντων κινδύνου και εκτιμάται με διάφορες τεχνικές, ωστόσο η πιο διαδεδομένη είναι η ταχύτητα του σφυγμικού κύματος ανάμεσα στην καρωτίδα-μηριαία αρτηρία, pulse-wave velocity) για τους ασθενείς σε κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα αλλά και για τους πάσχοντες από καρδιαγγειακά νοσήματα [272-274]. Η αξιολόγηση αυτών των παραμέτρων σε συνδυασμό με τους γνωστούς καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει παρουσιάσει βελτίωση της ανάδειξης των ατόμων σε κίνδυνο για μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα και αποτελεσματικότητα των χορηγούμενων θεραπειών ειδικά όταν εφαρμόζονται σε πρώιμο στάδιο, ωστόσο, δεν έχουν λάβει υψηλή ένδειξη σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες και μελετώνται κυρίως ερευνητικά [272, 273]. Ειδικά η αρτηριακή σκληρία αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη αγγειακής βλάβης σε υπερτασικούς ασθενείς και αντανakλά την ανάπτυξη βλάβης σε όργανα-στόχους (οφθαλμικά αγγεία, στεφανιαία επικαρδιακά αγγεία και μικροκυκλοφορία, νεφρικά αγγεία, περιφερικά αγγεία) [274]. Τέλος, ένας ακόμη σημαντικός δείκτης αγγειακής βλάβης είναι ο σφυροβραχιόνιος δείκτης (ankle-brachial index) που συνιστά το λόγο της συστολικής αρτηριακής πίεσης του άκρου ποδός προς του βραχίονα, που αναδεικνύει την ύπαρξη περιφερικής αγγειοπάθειας και σχετίζεται με την πρόγνωση των ασθενών [275].

Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται η πιθανή συνεισφορά των γενετικών, περιβαλλοντικών, απεικονιστικών και κυκλοφορούντων βιοδεικτών που σε συνδυασμό με τους παράγοντες κινδύνου μπορούν να ανιχνεύσουν διαταραχές σε υποκλινική μορφή πριν την εκδήλωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων [276].

Εικόνα 1: Βιοδείκτες του καρδιαγγειακού συστήματος [276].



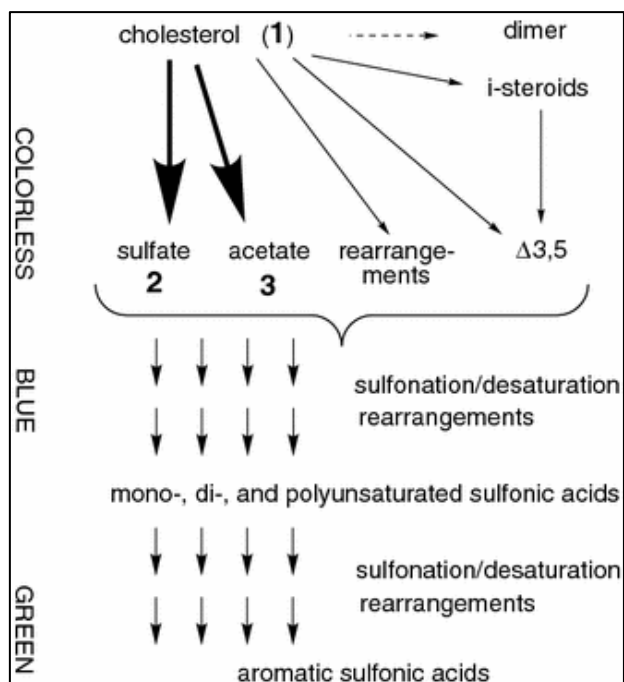
4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Ο προσδιορισμός των βιοδεικτών είναι ένα πεδίο με προεκτάσεις στη διάγνωση, τη θεραπεία των νοσημάτων και στην έρευνα και διαρκώς εξελίσσεται με την ανάπτυξη νέων τεχνικών με βελτιωμένες παραμέτρους απόδοσης (ευαισθησία, ειδικότητα, ακρίβεια, πιστότητα) και αυτοματοποιημένων αναλύσεων [277]. Στη μέτρηση των βιοδεικτών συνεισφέρουν οι μεθοδολογίες που εφαρμόζονται σε πολλά επιστημονικά πεδία όπως των επιστημών της Χημείας (κλασικές και ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης, ποσοτικής και ποιοτικής εκτίμησης), της Μοριακής Βιολογίας και της Βιοχημείας. Κάθε μέθοδος προσδιορισμού παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και επιλέγεται ανάλογα με τους σκοπούς της ανάλυσης και το κλινικό πλαίσιο, τη φύση του κλινικού δείγματος (ολικό αίμα, πλάσμα/ορός, ιστός, ούρα, κοκ.), το είδος του αναλύτη που πρόκειται να αναλυθεί (DNA, RNA, πρωτεΐνη) και παραμέτρους όπως η χρονική διάρκεια της ανάλυσης και οι ανάγκες σε εξειδικευμένο προσωπικό [278, 279]. Παρόλα αυτά, η πιο συνηθισμένη πηγή υλικού προς μελέτη για τους κυκλοφορούντες βιοδείκτες είναι το αίμα [279]. Μια παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη είναι το κόστος, ειδικά όταν πρόκειται για αρκετά σε αριθμό δείγματα και σύνθετες αναλύσεις (πχ. αναλύσεις γενετικού υλικού) όπου οι επεξεργασίες πολλαπλών δειγμάτων είναι περισσότερο αποδοτικές οικονομικά [280]. Στο σημείο αυτό θα γίνει σύντομη περιγραφή των βασικών αρχών των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων εργαστηριακών τεχνικών που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των βιοδεικτών και στην επόμενη ενότητα θα παρουσιαστούν οι πιο σημαντικοί (κυκλοφορούντες) βιοδείκτες του καρδιαγγειακού συστήματος που χρησιμοποιούνται κλινικά και που μελετώνται σε ερευνητικό επίπεδο. Οι μέθοδοι στις οποίες θα αναφερθούμε συνοπτικά είναι οι ακόλουθες: χημικές και ενζυμικές μέθοδοι, ανοσολογικές μέθοδοι (Enzyme-linked Immunosorbent Assay-ELISA, Radioimmunoassay-RIA, Western Blot, ανοσοφθορισμός, χρωματογραφία), η φασματομετρία μάζας καθώς επίσης και οι μοριακές τεχνικές (PCR και οι παραλλαγές της, αλληλούχηση DNA, ανάλυση πολυμορφισμών DNA και ανάλυση μικροσυστοιχιών).

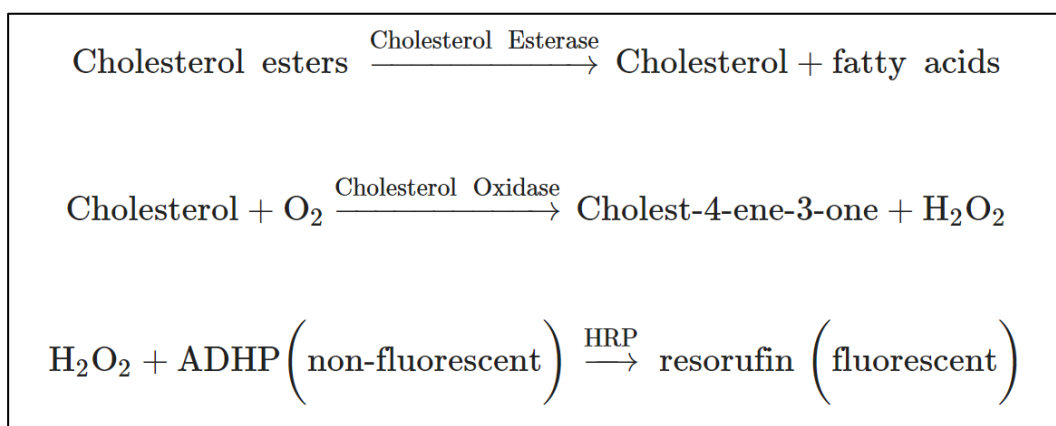
ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η λίστα των βιοδεικτών που μετρώνται με τη βοήθεια των χημικών και ενζυμικών μεθόδων είναι εκτενής. Στο σημείο αυτό θα περιγραφεί ο προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης με την κλασική χρωματομετρική μέθοδο Liebermann-Burchard και την ενζυμική μέθοδο Trinder σε δείγματα πλάσματος αίματος (**Εικόνες 2 και 3**) στην οποία έχει υπάρξει εμπειρία στα περισσότερα εργαστήρια [281]. Συγκεκριμένα, στην αντίδραση Liebermann-Burchard η χοληστερόλη εκτίθεται σε θειικό οξύ, οξικό ανυδρίτη και οξικό οξύ και μετατρέπεται σε ένα κυανοπράσινο προϊόν, το οποίο ποσοτικοποιείται με χρωματομετρία στα 410 nm όπου εμφανίζει τη μέγιστη απορρόφηση, παρόλα αυτά λόγω της απουσίας σταθερότητας του παραγόμενου προϊόντος χρωματικά, τείνει να εγκαταλειφθεί ως μέθοδος μέτρησης από άλλες μεθόδους όπως οι ενζυμικές μέθοδοι, που χρησιμεύουν επίσης στην εκτίμηση της HDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, που μετρώνται με αυτοματοποιημένους αναλυτές [282-284]. Στην ενζυμική αντίδραση Trinder οι εστέρες χοληστερόλης μετατρέπονται με τη βοήθεια της εστεράσης σε χοληστερόλη, η χοληστερόλη οξειδώνεται με τη βοήθεια της οξειδάσης σε H_2O_2 και ενδιάμεσα προϊόντα, τα οποία παρουσία της υπεροξειδάσης, της φαινόλης και της 4-αμινοφαιναζόνης δίνουν μια ερυθρή χρωστική ουσία που ποσοτικοποιείται στα 510 nm φωτομετρικά με συνέπεια τη δυνατότητα εκτίμησης της αρχικής ποσότητας ολικής χοληστερόλης του δείγματος με τη

βοήθεια της καμπύλης βαθμονόμησης (ισχύει η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης για τιμές ολικής χοληστερόλης ως 600mg/dl) [285, 286].



Εικόνα 2: Χρωματομετρική αντίδραση Liebermann-Burchard για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης [282].



Εικόνα 3: Ενζυμική αντίδραση Trinder για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα [286].

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

(ELISA, RIA, WESTERN BLOT, ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ, ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ, ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ)

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, ανοσοενζυμική μέθοδος προσρρόφησης)

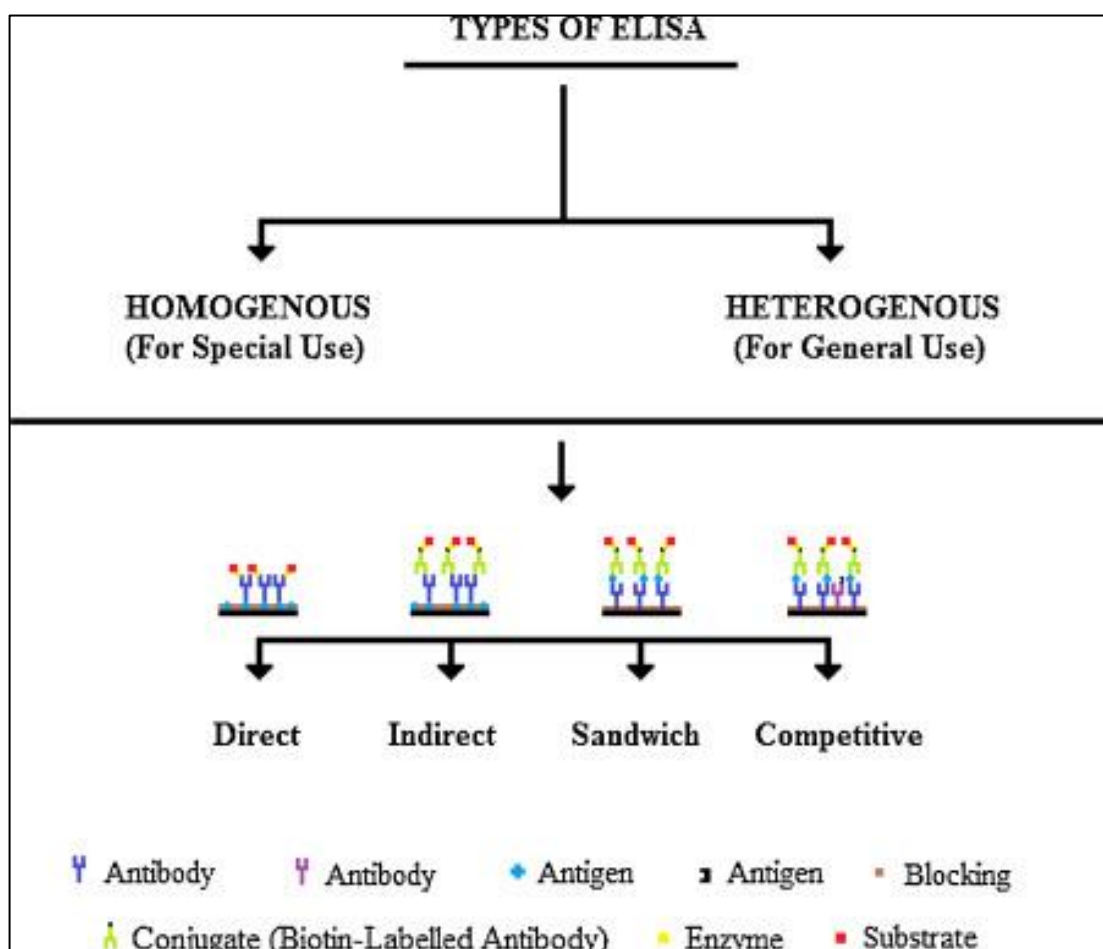
Η ELISA είναι μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για την ανάλυση κλινικών δειγμάτων (π.χ. ορός, πλάσμα, οποιοδήποτε βιολογικό υγρό) και στηρίζεται στη δυνατότητα ανίχνευσης αντιγόνων ή αντισωμάτων, από τα οποία το ένα έχει τη δυνατότητα σύνδεσης σε μια σταθερή επιφάνεια (πχ. αντίσωμα), ενώ το άλλο (πχ. αντιγόνο) μπορεί να ανιχνευθεί με βασική αρχή την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε ένα αντιγόνο-αντίσωμα [287]. Η ELISA είναι μια τεχνική που έχει αρκετές παραλλαγές και πρωτόκολλα τα οποία διαφέρουν σε επιμέρους λεπτομέρειες τους (ωστόσο, η αρχή της μεθόδου είναι η ίδια): άμεση ELISA, έμμεση, ανταγωνιστική, ανάστροφη, ELISA κατά Sandwich και ELISA με τη βοήθεια νανοσωματιδίων [287]. Η ELISA είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη τεχνική και το μεγάλο της πλεονέκτημα είναι η μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία ανίχνευσης που προσφέρει [287]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ουσιών που μπορούν να μετρηθούν με ELISA είναι αντισώματα έναντι λοιμωδών παραγόντων, αυτοαντισώματα, αντιγόνα μολυσματικών παραγόντων, ορμόνες, έκθεση σε φάρμακα, καρκινικοί δείκτες [288]. Επίσης, μπορεί να εφαρμοσθεί για ποιοτική ή ποσοτική αξιολόγηση ενός βιοδείκτη σε ένα δείγμα [289].

Τα γενικά βήματα της ELISA και συγκεκριμένα της ELISA κατά Sandwich (που είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές) γίνονται με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού δείγματος σε μικροπλακίδια (96-Well Microplates) και είναι τα εξής [287]:

- Σύνδεση ενός αντιγόνου (ή ενός αντισώματος αντίστοιχα) με τη βοήθεια μη-ειδικών μεθόδων προσρρόφησης ή με χημικούς δεσμούς πάνω σε μια σταθερή επιφάνεια (πχ. πλαστική επιφάνεια). Η πιο συνηθισμένη εκδοχή της μεθόδου αφορά τη σύνδεση ενός αντισώματος πάνω σε μια σταθερή επιφάνεια, στην οποία ο σκοπός της ανάλυσης αφορά τη μέτρηση ενός υπό μελέτη αντιγόνου. Ωστόσο, μπορεί να γίνει και το αντίστροφο, δηλαδή πρόσδεση ενός αντιγόνου σε σταθερή επιφάνεια με σκοπό τη στόχευσή του από ένα ειδικό αντίσωμα.
- Διενέργεια πλύσεων με κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος.
- Προσθήκη ενός ενζύμου συζευγμένου με αντίσωμα, το οποίο δημιουργεί την εξής σύνδεση: αντίσωμα συνδεδεμένο στη στερεή επιφάνεια-αντιγόνο-αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο.
- Προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου (πχ. αλκαλική φωσφατάση) που θα οδηγήσει στην παραγωγή ενός τελικού προϊόντος που συχνά οδηγεί σε αλλαγή χρώματος (η αλλαγή του χρώματος μπορεί να ερμηνευθεί εύκολα οπτικά και υποδηλώνει την παρουσία του αντιγόνου που εξετάζεται, και αυτό δίνει τη δυνατότητα ποικιλίας εφαρμογών [290, 291]).
- Τελική ανάγνωση του παραγόμενου προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης. Η αλλαγή του χρώματος της αντίδρασης ανιχνεύεται από κατάλληλο λογισμικό και αντιστοιχίζεται η οπτική πυκνότητα με τη συγκέντρωση του αναλύτη [289]. Συγκεκριμένα, κατασκευάζεται μια πρότυπη σιγμοειδής καμπύλη από τη μέτρηση των διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος, απεικονίζοντας στον άξονα Χ τις

συγκεντρώσεις και στον άξονα Y την απορρόφηση σε κάθε plate από τη χρήση των πρότυπων υλικών με αποτέλεσμα να μπορεί να εκτιμηθεί η μέτρηση του άγνωστου δείγματος που ενδιαφέρει την ανάλυση [287].

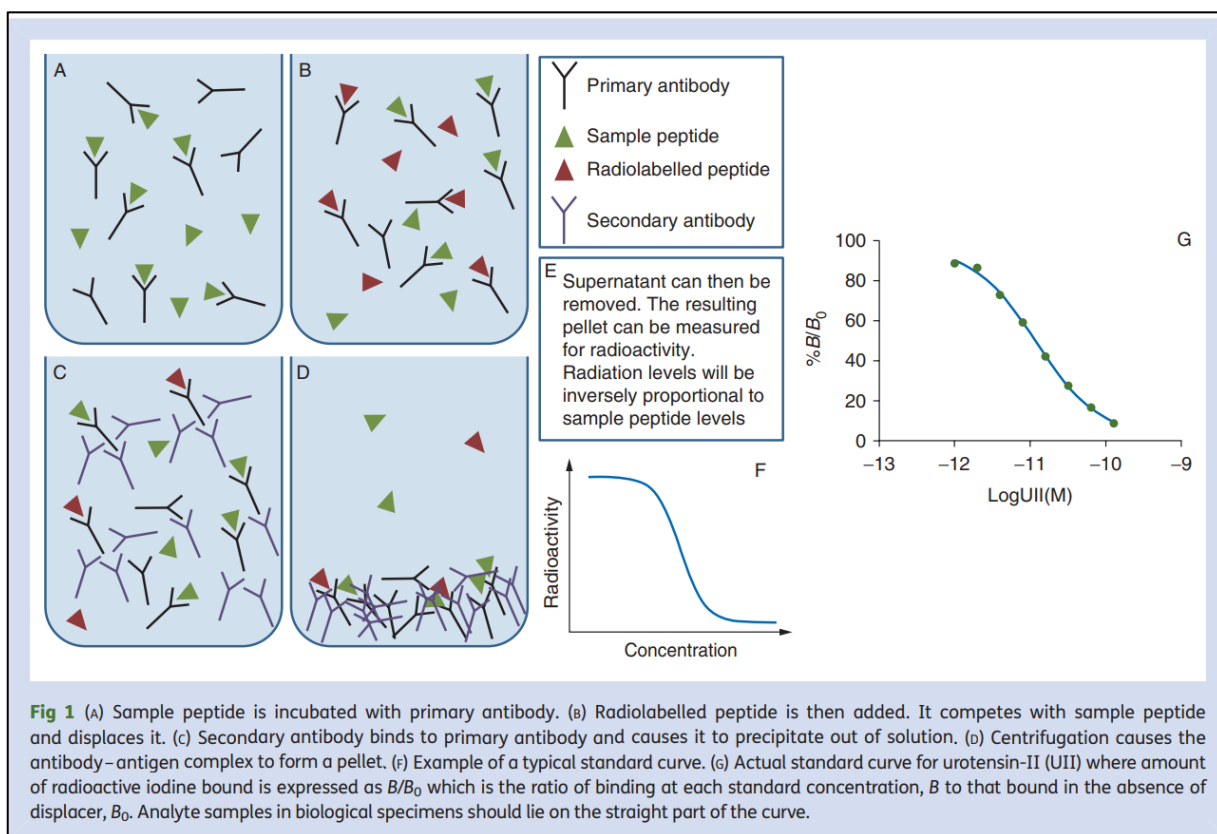
Στην εικόνα 4 παρουσιάζονται οι παραλλαγές της ELISA [289]. Υπογραμμίζεται ότι για τη λήψη ενός άρτιου αποτελέσματος χρειάζονται κατάλληλα υλικά και η ακολούθηση ενός αυστηρού πρωτοκόλλου, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο παράγοντας λάθους κατά την ανάγνωση των αποτελεσμάτων [289].



Εικόνα 4: Τύποι ELISA (Άμεση, έμμεση, sandwich, ανταγωνιστική) [289].

Radioimmunoassay-RIA

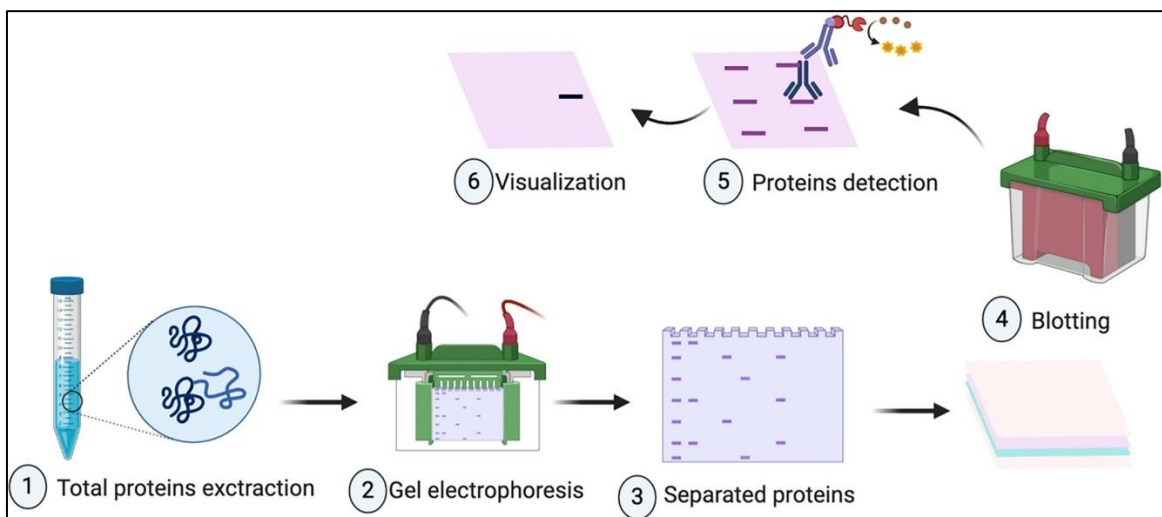
Η βασική αρχή της ραδιοανοσολογικής μεθόδου στηρίζεται στην προσπάθεια ανίχνευσης ενός υπό εξέταση αντιγόνου σε ένα δείγμα (Εικόνα 5). Συγκεκριμένα, γίνεται επώαση του υπό εξέταση αντιγόνου με ένα συμπληρωματικό αντίσωμα και προστίθεται ένα ακόμη αντιγόνο το οποίο είναι ραδιοσημασμένο. Το ραδιοσημασμένο αντιγόνο που προστίθεται στο δείγμα ανταγωνίζεται με το υπό μελέτη αντιγόνο για την πρόσδεση στο αντίσωμα. Επιπλέον, είναι δυνατό να προστεθεί και δεύτερο αντίσωμα που προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Λόγω της περίσσειας του αντισώματος σε σχέση με το αντιγόνο αυτό καθιζάνει μετά από φυγοκέντρηση του μείγματος. Κατά αυτόν τον τρόπο, το ραδιοσημασμένο αντιγόνο ποσοτικοποιείται δίνοντας τη δυνατότητα μέτρησης του υπό μελέτη αντιγόνου [292]. Ωστόσο, λόγω της χρήσης ραδιοσημασμένων μορίων (συνηθέστερα ^{125}I), η ραδιοανοσολογική μέθοδος έχει περιοριστεί και στη θέση της χρησιμοποιούνται άλλες ανοσοενζυμικές τεχνικές και τεχνικές ανοσοφθορισμού, παρότι έχει ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα [293, 294]. Η χρήση της τεχνικής αυτής είναι διαδεδομένη για τη μέτρηση ορμονών (πχ. ινσουλίνη, ανίχνευση στεροειδών ορμονών) [293, 295].



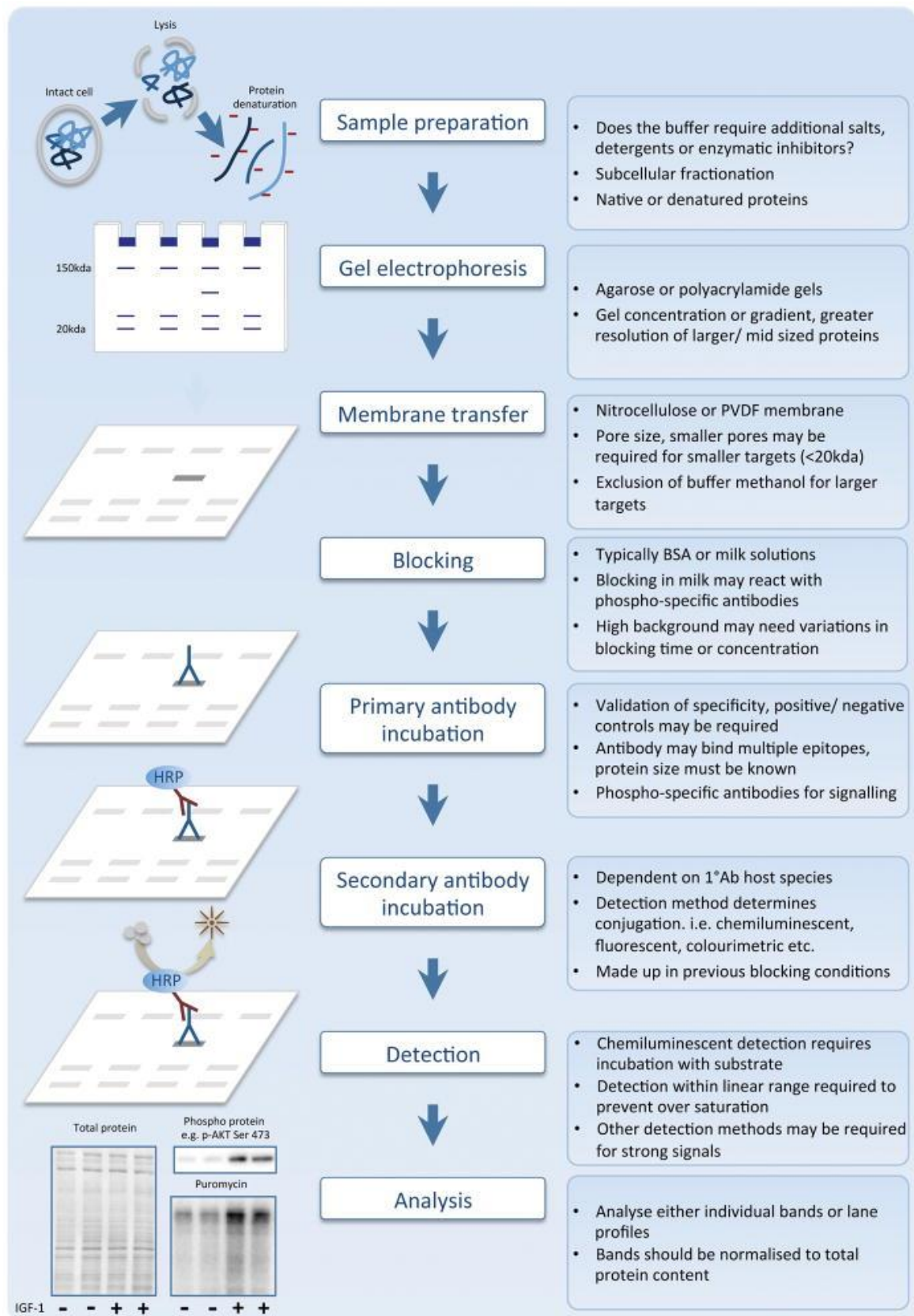
Εικόνα 5: Ραδιοανοσολογική μέθοδος [292].

Western Blot

Η τεχνική Western blot (ή ανοσοστύπωμα κατά Western) αποτελεί μια από τις συνηθέστερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών (Εικόνα 6 και 7) [296]. Συγκεκριμένα, από ένα αρχικό σύνθετο μείγμα (πχ. με προέλευση από ιστούς, κύτταρα) που αποτελείται από διάφορα βιομόρια, οι πρωτεΐνες (φυσικές ή μετουσιωμένες) αρχικά εξάγονται (και ανάλογα με την υπό μελέτη πρωτεΐνη είναι απαραίτητη η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων ή ενζύμων ώστε να αποφευχθούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους) [297]. Στη συνέχεια, το υπό μελέτη δείγμα φορτώνεται σε gel πολυακρυλαμίδης, σημαίνεται με χρωστικές (πχ. Coomassie), εφαρμόζονται ρυθμιστικά διαλύματα, τοποθετείται ηλεκτρικό πεδίο και το δείγμα μετακινείται επί του gel με βασική αρχή το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το σωματικό βάρος τους (συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες χαμηλότερου μοριακού βάρους κινούνται ταχύτερα επί του gel) [296, 298]. Εν συνεχεία, όταν έχει γίνει ο διαχωρισμός σε ζώνες, το αποτέλεσμα της ανάλυσης μεταφέρεται σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης [297]. Η υπό μελέτη πρωτεΐνη ανιχνεύεται από ένα πρωτογενές αντίσωμα που τη στοχεύει, εν συνεχεία προστίθεται ένα δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία ή με χρωστικές όπως η Horseradish peroxidase και μετρώνται σύμφωνα με τις αρχές του ανοσοφθορισμού και της χημειοφωταύγειας [296]. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η ειδικότητα, η αναπαραγωγιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου παρότι πρόκειται περί μιας ημιποσοτικής μεθόδου που είναι επιρρεπής σε τεχνικά λάθη [297]. Η ποσοτικοποίηση του υπό μελέτη αντιγόνου γίνεται με την ανίχνευση του παραγόμενου σήματος, που είναι ανάλογο της σύνδεσης αντιγόνου/αντισώματος και οι παραγόμενες ζώνες αναλύονται από ειδικό λογισμικό [297]. Η χρήση της Western blot είναι ευρέως διαδεδομένη και είναι εφικτό να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν ισομορφές πρωτεϊνών, τυχόν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με πρωτεΐνες ή DNA, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών, ο εντοπισμός της θέσης των πρωτεϊνών σε σχέση με τα κυτταρικά διαμερίσματα και τέλος η μελέτη των αντισωμάτων [299].



Εικόνα 6: Τεχνική Western blot [298]



Εικόνα 7: Τεχνική Western blot [298]

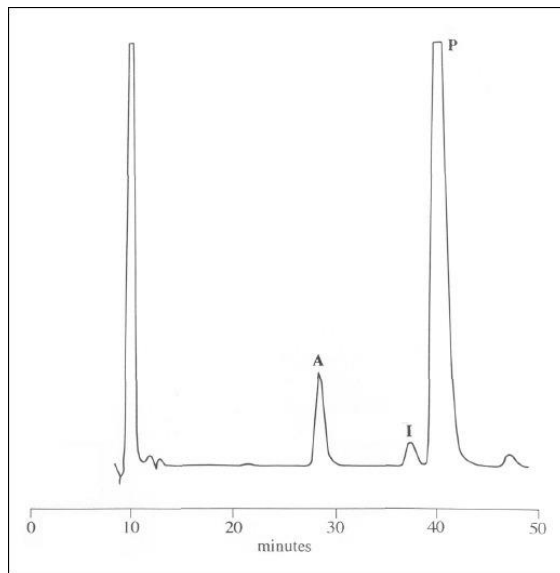
Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί μια ανοσοχημική τεχνική κατά την οποία ανιχνεύονται και εντοπίζονται ποικίλα αντιγόνα σε ιστούς, κύτταρα ή και ολόκληρους οργανισμούς με τη βοήθεια της μικροσκοπίας, επιτυγχάνει ικανοποιητική ευαισθησία σε σχέση με την ανοσοιστοχημεία και διακρίνεται στον άμεσο και τον έμμεσο ανοσοφθορισμό [300]. Κατά τη μέθοδο αυτή, αρχικά το δείγμα υφίσταται επεξεργασία (fixation) ώστε να διατηρηθούν ακέραια τα υπό μελέτη αντιγόνα χωρίς διαταραχή της σύστασης του δείγματος, κατόπιν τοποθετείται σε παραφίνη για να σταθεροποιηθεί ώστε να μπορούν να εφαρμοσθούν κατάλληλες χρωστικές, αντιδραστήρια και αντισώματα που θα στοχεύσουν το εξεταζόμενο αντιγόνο [300]. Κατά τον άμεσο ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιείται ένα πρωτεύον αντίσωμα που είναι συζευγμένο με ένα μόριο που εκπέμπει φθορισμό (φθορίζον αντίσωμα), το οποίο στοχεύει ένα αντιγόνο υπό μελέτη χωρίς ανάγκη για περαιτέρω εκπλύσεις, γεγονός που κάνει αυτή την παραλλαγή της μεθόδου πιο ταχεία [300]. Από την άλλη, κατά τον έμμεσο ανοσοφθορισμό ένα αρχικό πρωτεύον αντίσωμα στοχεύει το υπό μελέτη αντιγόνο ενώ ένα δευτερογενές αντίσωμα που φθορίζει, στοχεύει το πρωτογενές αντίσωμα [300]. Αρκετές παράμετροι καθορίζουν την επιλογή των καταλληλότερων αντισωμάτων, των φθορίζουσών χρωστικών που θα χρησιμοποιηθούν και που εκπέμπουν σήμα φθορισμού μετά από διέγερση, ενώ η χρήση πολυκλωνικών ή βιοτυνυλιωμένων δευτερογενών αντισωμάτων δίνει τη δυνατότητα ενίσχυσης του παραγόμενου σήματος φθορισμού [300]. Στα σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνικής ανήκουν η ειδικότητά της και η δυνατότητα ανίχνευσης ποικίλων αντιγόνων ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια [300]. Παρόλα αυτά ως μειονεκτήματα αναφέρονται πιθανές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντισωμάτων και η ιδιότητα αυτοφθορισμού του δείγματος [301]. Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού διαρκώς εξελίσσεται και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε ερευνητικό αλλά και κλινικό επίπεδο ειδικά στις ειδικότητες της Ογκολογίας και της Ανοσολογίας, ενώ στην Καρδιολογία υπογραμμίζεται η συνεισφορά της στην εμβρυολογία του καρδιαγγειακού συστήματος και στη μελέτη των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε διάφορα μονοπάτια του καρδιαγγειακού συστήματος (οξειδωτικό στρες, ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων κλπ) [302-304].

Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία (Εικόνα 8) αποτελεί μια τεχνική κατά την οποία οι ουσίες ενός μείγματος διαχωρίζονται μεταξύ τους καθώς το δείγμα μετακινείται διαμέσου μιας στατικής φάσης με τη βοήθεια μιας κινητής φάσης [305]. Κατά αυτόν τον τρόπο, άλλα συστατικά του μείγματος παραμένουν περισσότερο χρόνο και κινούνται πιο αργά στη στατική φάση ενώ άλλα κινούνται γρηγορότερα και παραμένουν για λιγότερο χρόνο, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους (και την παρουσία διαφορετικού χρόνου κατακράτησης εντός της στήλης της χρωματογραφίας), φαινόμενο που εξηγείται από τις υποκείμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της κινητής, στατικής φάσης και του δείγματος λόγω χημικής συγγένειας, πολικότητας και μοριακού βάρους [306, 307]. Η στατική φάση μπορεί να είναι ένα στερεό ή ένα υγρό που προσρροφάται σε ένα στερεό στήριγμα, ενώ από την άλλη η κινητή φάση μπορεί να είναι ένα υγρό ή ένα αέριο [305, 308]. Αρχικά, ο αναλύτης που εμπεριέχεται στο δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί υφίσταται επεξεργασία για την αποφυγή προσμίξεων και για την επίτευξη μέγιστης καθαρότητας, κατόπιν το δείγμα ενίεται στη χρωματογραφική στήλη, γίνεται ο διαχωρισμός - έκλυση των προϊόντων (σε διαφορετικούς χρόνους και συγκεντρώσεις ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, που

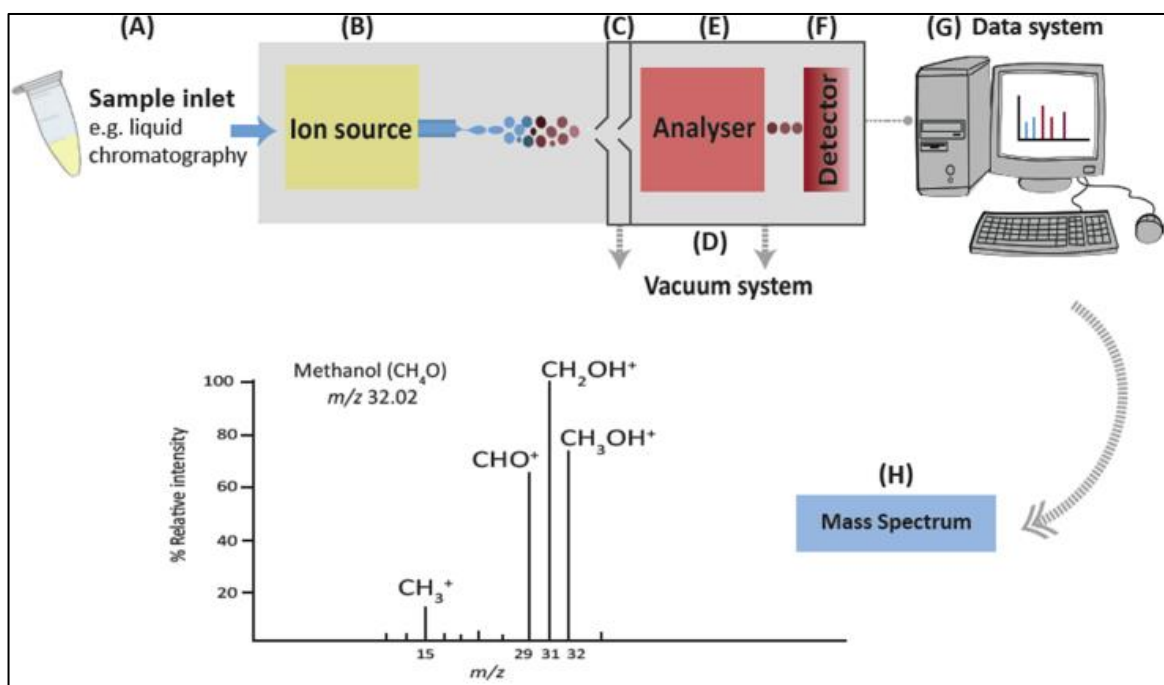
περιγράφηκαν παραπάνω) και ένας ανιχνευτής παρακολουθεί διαρκώς την μετακίνηση της κινητής φάσης δίνοντας τα αποτελέσματα της έκλουσης στο χρωματογράφο υπό μορφή τάσης [309, 310]. Οι συνηθέστεροι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία είναι οι ανιχνευτές φασματομετρίας μάζας, φασματομετρίας υπεριώδους-ορατού, ιονισμού φλόγας [309]. Εάν η κινητή φάση είναι αέρια, τότε πρόκειται για αέρια χρωματογραφία (Gas chromatography, GC), ενώ αντιθέτως εάν η κινητή φάση είναι υγρή, τότε πρόκειται για υγρή χρωματογραφία (Liquid chromatography LC) [305]. Συνήθως, η GC εφαρμόζεται για αέρια μείγματα, πτητικά υγρά και στερεά ενώ από την άλλη η LC εφαρμόζεται για θερμικά ασταθή και μη-πτητικά δείγματα [305]. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές υποκατηγορίες της τεχνικής πέρα από τη GC και την LC, όπως η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, η χρωματογραφία στήλης και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High-Pressure Liquid Chromatography, HPLC), μεταξύ πολλών ακόμη τεχνικών, με διαφορετικές εφαρμογές και τεχνικές απαιτήσεις [305]. Παράλληλα, έχουν σημειωθεί σημαντικές εξελίξεις στις τεχνικές της χρωματογραφίας λόγω της χρήσης εξοπλισμού με μεγαλύτερο εύρος συνθηκών εργασίας και βελτιστοποιημένων δυνατοτήτων διαχωρισμού των ουσιών (συνθήκες pH, θερμοκρασίας, υλικό χρωματογραφικής στήλης κοκ.) [311, 312]. Αρκετά βιολογικά δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση όπως το πλάσμα, ο ορός, το ολικό αίμα, τα ούρα και ο σίελος [313]. Συνήθεις εφαρμογές της χρωματογραφίας και των υποκατηγοριών της στο χώρο των βιοεπιστημών αφορούν το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση βιομορίων όπως τα λιπίδια, αμινοξέα, νουκλεικά οξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και άλλα βιολογικά δραστικά μόρια, η μελέτη φαρμάκων (πχ. φαρμακοκινητική), η έρευνα νέων βιομορίων και των ιδιοτήτων τους [307, 314].



Εικόνα 8: Τυπικό χρωματογράφημα [309].

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (Mass spectrometry, MS)

Η φασματομετρία μάζας (Εικόνα 9) είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην εργαστηριακή ιατρική και στην έρευνα για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ενός δείγματος καθώς δίνει πληροφορίες για τη σύστασή του ως προς τα μόρια που το αποτελούν (μοριακή μάζα και δομή) [315]. Η φασματομετρία μάζας μπορεί να συζευχθεί με ποικίλες αναλυτικές τεχνικές (όπως η χρωματογραφία-GC/MS, HPLC/MS και η φασματομετρία μάζας σε σειρά-tandem MS), με δυνατότητα επέκτασης των εφαρμογών της σε αρκετά πεδία, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την πρωτεομική ανάλυση (μελέτη πρωτεϊνών, σύνθετων πρωτεϊνικών μορίων, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών, μεταβολωμική και λιπιδωμική ανάλυση), τη μελέτη νέων φαρμάκων και σύνθετων κλινικών δειγμάτων [315-318]. Στη φασματομετρία μάζας τα μόρια του υπό μελέτη δείγματος υπόκειται σε ιονισμό και εν συνεχεία διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο μάζα προς φορτίο με αποτέλεσμα να δίδονται πληροφορίες για τη σύσταση του αρχικού δείγματος μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα γνωστών βάσεων δεδομένων με μόρια που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα [319]. Αναλυτικότερα, τα μόρια του υπό μελέτη δείγματος μετά από κατάλληλη επεξεργασία (καθώς θα πρέπει να βρίσκονται σε υδατική ή αέρια μορφή και χωρίς προσμίξεις που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα) ιονίζονται κατόπιν έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία (συχνότερα με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού, ή της matrix-assisted laser desorption/ionization) και μετατρέπονται σε αέρια μορφή (ιόντα με θετικό φορτίο) που επιταχύνονται εντός ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου μέσα στον αναλυτή μαζών όπου σταδιακά διαχωρίζονται με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο, και καταλήγουν στον ανιχνευτή, όπου το σήμα μετατρέπεται σε διάγραμμα μάζας προς φορτίο για κάθε μόριο [320-323].



Εικόνα 9: Απεικόνιση εφαρμοζόμενης μεθοδολογίας στη φασματομετρία μαζών [324].

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

(PCR και ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ PCR, ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ DNA, ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ DNA, ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ)

Η αξιολόγηση των γενετικών χαρακτηριστικών ενός ατόμου είναι πολύ σημαντική στο χώρο της έρευνας και της νοσολογίας καθώς μια σειρά παθολογικών καταστάσεων έχουν αποδοθεί σε γενετικούς παράγοντες και αφορούν βλάβες σε γονίδια, χρωμοσώματα ή σε παραγόμενες πρωτεΐνες τους που οδηγούν σε ευπάθεια για τη νόσο, βοηθούν στη διάγνωση, επηρεάζουν την πρόγνωση, την ανταπόκριση στη θεραπεία (Φαρμακογονιδιωματική) και δίνουν τη δυνατότητα περαιτέρω μελέτης και έρευνας για πιθανή γονιδιακή θεραπεία [325]. Οι εξελίξεις στις διαγνωστικές μεθόδους έχουν οδηγήσει στη μείωση του κόστους του γενετικού ελέγχου και σε δυνατότητα ευρύτερης εφαρμογής του ανάλογα με τις ιατρικές ενδείξεις καθώς η γνώση αυτών των παραμέτρων είναι πολύτιμη για τη σωστή διάγνωση των πασχόντων, την ανίχνευση των συγγενών που βρίσκονται σε κίνδυνο για νόσο ώστε να παρασχεθεί κατάλληλη γενετική συμβουλευτική, να υποβοηθηθεί ο προγεννητικός έλεγχος και ο έλεγχος της απάντησης σε φαρμακευτικές θεραπείες ώστε να καθοριστεί η καταλληλότητα χορήγησης μιας θεραπευτικής αγωγής αλλά και του βέλτιστου δοσολογικού σχήματός της [325]. Ωστόσο, τα ευρήματα του γενετικού ελέγχου θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, λαμβάνοντας υπόψη τις κλινικές πληροφορίες και ειδικά σε περιπτώσεις με αποτελέσματα με αμφίβολη ερμηνεία, πέραν της ανάγκης για τήρηση των κανόνων της Βιοηθικής [326, 327]. Στο σημείο αυτό θα περιγραφούν συνοπτικά οι πιο συχνές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο όπως η PCR (και οι παραλλαγές της), η αλληλούχηση DNA (και κυρίως η μέθοδος Sanger), η ανίχνευση πολυμορφισμών μονήρους νουκλεοτιδίου (SNPs) και τέλος οι μικροσυστοιχίες.

Polymerase Chain Reaction-PCR και παραλλαγές PCR

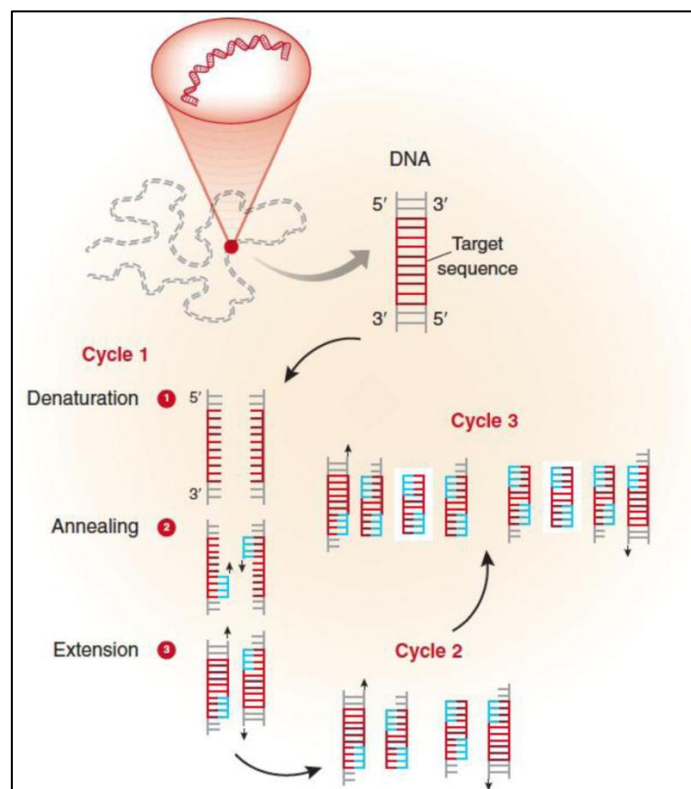
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές στην έρευνα και στην κλινική πρακτική καθώς δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης γενετικού υλικού μέσα από ένα σύνθετο μείγμα μορίων, αλληλούχησης του γενετικού υλικού με ταχύ τρόπο, με αποκορύφωμα το ρόλο της στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος ενώ σημειώνεται ότι έχει αρκετές παραλλαγές ανάλογα με τη μελετούμενη περίπτωση [328, 329]. Άλλες σημαντικές εφαρμογές της σημειώνονται στην Ιατροδικαστική και στην ανίχνευση μολυσματικών παραγόντων [328]. Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στην PCR είναι ποικίλλα (αίμα, σίελος, ιστοί, τρίχες κλπ.) [328]. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου ανήκουν οι ελάχιστες ποσότητες γενετικού υλικού που χρειάζονται για την ανίχνευση του υπό μελέτη γενετικού στόχου, συνεπώς η ευαισθησία της μεθόδου και η ταχύτητα λήψης των αποτελεσμάτων είναι υψηλές, ενώ από την άλλη στα μειονεκτήματα αναφέρονται ότι χρειάζεται η εκ των προτέρων γνώση του DNA-στόχου ώστε να χρησιμοποιηθούν οι καταλληλότεροι εκκινητές αλλά και ότι οι εκκινητές μπορεί να υβριδοποιούνται σε παρόμοιες αλληλουχίες με τον υπό μελέτη-στόχο [328].

Για τη διενέργεια της PCR χρειάζονται τα εξής βήματα: παρουσία ενός εκμαγείου DNA, ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (μικρά τμήματα DNA που είναι συμπληρωματικά

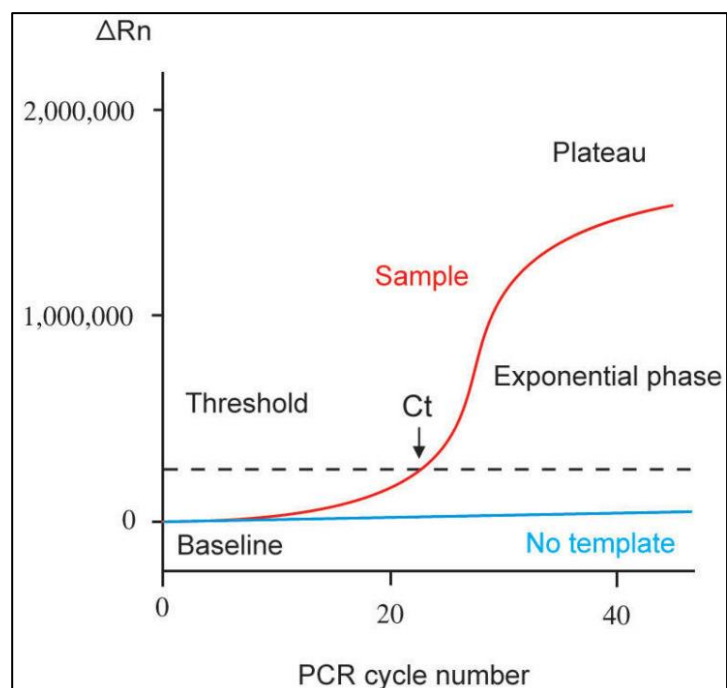
με την αλληλουχία-στόχο του μορίου που πρόκειται να πολυμερισθεί), νουκλεοτιδίων (αδενίνη, θυμίνη, κυτοσίνη, γουανίνη) και ενζύμων (DNA πολυμεράση, Taq πολυμεράση), που τοποθετούνται σε 96-well plate και έπειτα εντός του θερμικού κυκλοποιητή όπου θα γίνει η αντίδραση πολυμερισμού σε σταδιακά βήματα με ρύθμιση της θερμοκρασίας (Εικόνα 10) [328, 330]. Αναλυτικότερα, στο πρώτο βήμα της PCR γίνεται η αποδιάταξη του DNA με συνέπεια το άνοιγμα της δίκλωνης έλικας DNA σε θερμοκρασία λίγο παραπάνω από το σημείο τήξης του DNA (95 βαθμοί Κελσίου), κατόπιν η θερμοκρασία μειώνεται ώστε οι εκκινητές βάσει της αρχής της συμπληρωματικότητας να συνδεθούν στο DNA-εκμαγείο (υβριδισμός, ιδανικά στους 37-72 βαθμούς Κελσίου) και κατόπιν η θερμοκρασία αυξάνεται και γίνεται η αντίδραση του πολυμερισμού (ιδανικά στους 55-72 βαθμούς Κελσίου) [331, 332]. Τα παραπάνω βήματα πραγματοποιούνται πολλές φορές σε κύκλους ώστε τελικά από ένα αρχικό μόριο DNA σε κάθε βήμα να διπλασιάζεται το αρχικό μόριο DNA και τελικά να λαμβάνονται δισεκατομμύρια μόρια, ενώ μετά από 30-40 κύκλους η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται λόγω μείωσης της δραστηριότητας των αντιδραστηρίων [331]. Είναι πολύ σημαντικό να τηρούνται τα πρωτόκολλα εργασίας και των χρησιμοποιούμενων υλικών καθώς μικρές μεταβολές μπορεί να οδηγήσουν σε λάθος αποτέλεσμα [333]. Το παραγόμενο προϊόν της PCR οπτικοποιείται συχνότερα με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης και χρήση χρωστικής που παρεισφρύνει εντός του DNA (βρωμιούχο αιθίδιο) όπου τα DNA προϊόντα μετακινούνται στο gel και διαχωρίζονται βάση του μεγέθους τους, το οποίο συγκρίνεται με DNA μόρια γνωστού μεγέθους (ποιοτική ανίχνευση προϊόντος) [328].

Από την άλλη, η ποσοτικοποίηση του DNA γίνεται με τη βοήθεια της real-time PCR όπου τα μόρια DNA που ενισχύονται από την αντίδραση PCR ποσοτικοποιούνται κατά τη διενέργεια της αντίδρασης και απεικονίζονται υπό μορφήν καμπύλης, στην οποία υπάρχουν διακριτές φάσεις αύξησης του προϊόντος που παράγεται: αρχική φάση, εκθετική (λογαριθμική) φάση και η φάση πλατό (Εικόνα 11) [334]. Οι δύο μέθοδοι ποσοτικής real-time PCR που χρησιμοποιούνται διευκολύνονται είτε από τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών που συνδέονται μη-ειδικά με το δίκλωνο DNA είτε με τη χρήση ειδικών ως προς την αλληλουχία ανιχνευτών συζευγμένων με φθορίζουσες χρωστικές που ανιχνεύουν το συμπληρωματικό τους κλώνο DNA [330]. Ένα σημαντικό σημείο κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό και της εκτίμησης των προϊόντων της PCR από τη λαμβανόμενη καμπύλη είναι το σημείο C_q, που αντανακλά τους κύκλους που έφτασε η αντίδραση πολυμερισμού και που δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού της αρχικής ποσότητας του υπό μελέτη γενετικού υλικού, καθώς όσο περισσότερα μόρια έχει το αρχικό δείγμα, τόσο μικρότεροι είναι οι κύκλοι PCR που χρειάζεται να γίνουν, συνεπώς τόσο μεγιστοποιείται το σήμα φθορισμού [335, 336]. Η ποσοτικοποίηση αυτή γίνεται μετά από κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης και ανεύρεσης του σημείου C_q [336]. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό και έχει δώσει τη δυνατότητα χρήσης της τεχνικής σε εφαρμογές όπως η ανίχνευση των μικροβιακών παραγόντων και η ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου [337]. Τέλος, όταν το αρχικό γενετικό υλικό είναι RNA όπως το mRNA, η χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι η reverse transcription PCR κατά την οποία με την προσθήκη της αντίστροφης μεταγραφάσης το RNA μετατρέπεται σε cDNA και εν συνεχεία ακολουθούνται τα βήματα της συμβατικής PCR [330].

Εικόνα 10: Βήματα μεθοδολογίας PCR [328].



Εικόνα 11: Καμπύλη αντίδρασης real-time PCR [338].



ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ DNA

Η αλληλούχιση του γενετικού υλικού είναι ένα σημαντικό εργαλείο στην έρευνα καθώς δίνει τη δυνατότητα καθορισμού των νουκλεοτιδικών καταλοίπων του DNA και RNA τόσο για μικρές αλληλουχίες βάσεων αλλά και για αλληλουχίες εκατομμυρίων βάσεων γεγονός που εφαρμόζεται σε ευρεία σειρά εφαρμογών [339]. Οι μεθοδολογίες αλληλούχισης του γενετικού υλικού έχουν εξελιχθεί και από τις μεθοδολογίες πρώτης γενιάς, ακολούθησαν οι μέθοδοι δεύτερης γενιάς και τρίτης γενιάς με βελτίωση στο κόστος, στα χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα εργασίας και στην ταχύτητα της ανάλυσης [339]. Η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next generation sequencing) αποτελεί την πιο πρόσφατη εξέλιξη κατά την οποία υπάρχει η δυνατότητα αλληλούχισης και λήψης τρισεκατομμυρίων δεδομένων, κατασκευής βάσεων δεδομένων και λήψης πληροφοριών που συχνά ενημερώνονται και εμπλουτίζονται από στιγμή σε στιγμή, ωστόσο με υψηλό κόστος [340]. Με την αλληλούχιση νέας γενιάς μπορούν να ανιχνευθούν και άλλες καταστάσεις όπως η μεθυλίωση των γονιδίων, το εναλλακτικό μάτισμα, η έκφραση των small RNAs, συγκεκριμένων αλληλίων και απλοτύπων [327, 341]. Η μέθοδος κατά Sanger (στην οποία θα γίνει συζήτηση στο σημείο αυτό) είναι από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές πρώτης γενιάς, αποτελεί τη βάση των νεότερων τεχνικών και συνήθως χρησιμοποιείται για αλληλουχίες γενετικού υλικού μεγέθους 800-1000bp [342]. Ωστόσο, δεν είναι κατάλληλη για ανίχνευση διαφορών σε επίπεδο ζεύγους βάσεων για μεγαλύτερα μεγέθη DNA (900bp) και μπορεί τα πρώτα 15-40 ζεύγη βάσεων να μην είναι ποιοτικά σωστά λόγω της μη-κατάλληλης πρόσδεσης των εκκινητών [342]. Στη μέθοδο αυτή, το ενισχυμένο μόριο DNA (ή το cDNA) ευθυγραμμίζεται με έναν ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή, προστίθεται η DNA πολυμεράση για την αντίδραση πολυμερισμού, μείγμα των τεσσάρων δεοξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ή διδεοξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων, τα οποία τερματίζουν τη σύνθεση της νέας αλυσίδας (ddNTPs: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) σε διαφορετική θέση κάθε φορά, παράγοντας τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους που υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση για το διαχωρισμό τους (Εικόνα 12) [343]. Στις αρχικές εκδοχές της μεθόδου η αντίδραση κατά Sanger γινόταν σε τέσσερα διαφορετικά στάδια, σε καθένα από το οποίο γινόταν προσθήκη του μονόκλωνου DNA-εκμαγείου, του εκκινητή, της DNA πολυμεράσης και του μείγματος των μη-τροποποιημένων νουκλεοτιδίων και ενός σημασμένου διδεοξυ-τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου, με συνέπεια η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα να τερματίζεται σε διαφορετικό σημείο στο 3' άκρο της λόγω της παρουσίας του διδεοξυ-τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου [342]. Στις νεότερες εξελίξεις της μεθόδου ανήκουν η σήμανση των διδεοξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων με ξεχωριστές φθορίζουσες χρωστικές, γεγονός που διευκολύνει τη διενέργεια της αντίδρασης σε ένα κοινό αντιδραστήριο, την ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση και την ανάγνωση του αποτελέσματος από ηλεκτρονικό υπολογιστή [344].

Εικόνα 12: Μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger [343].

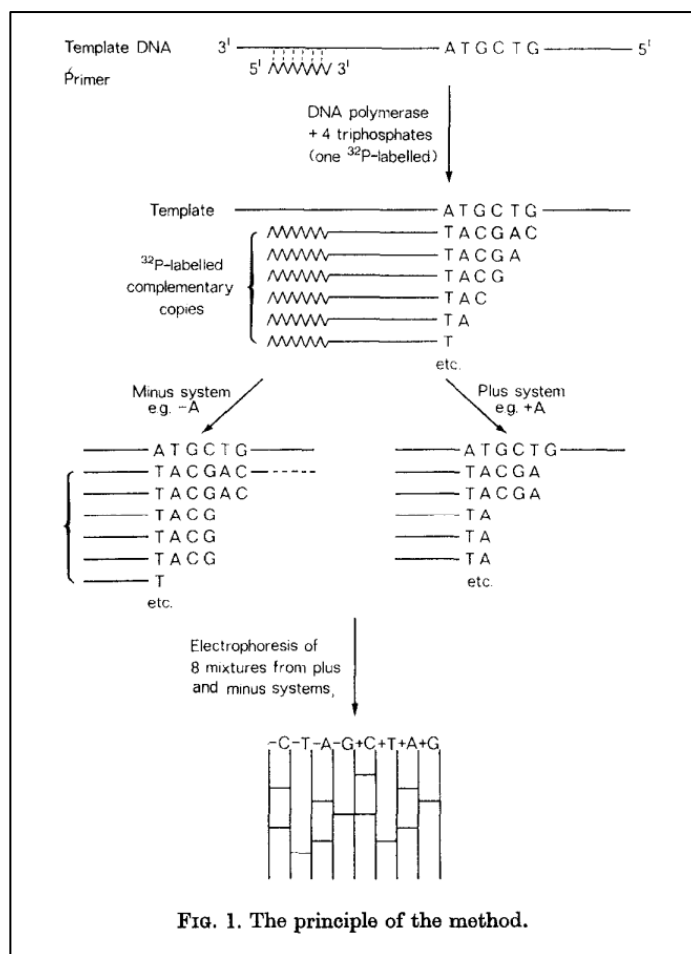
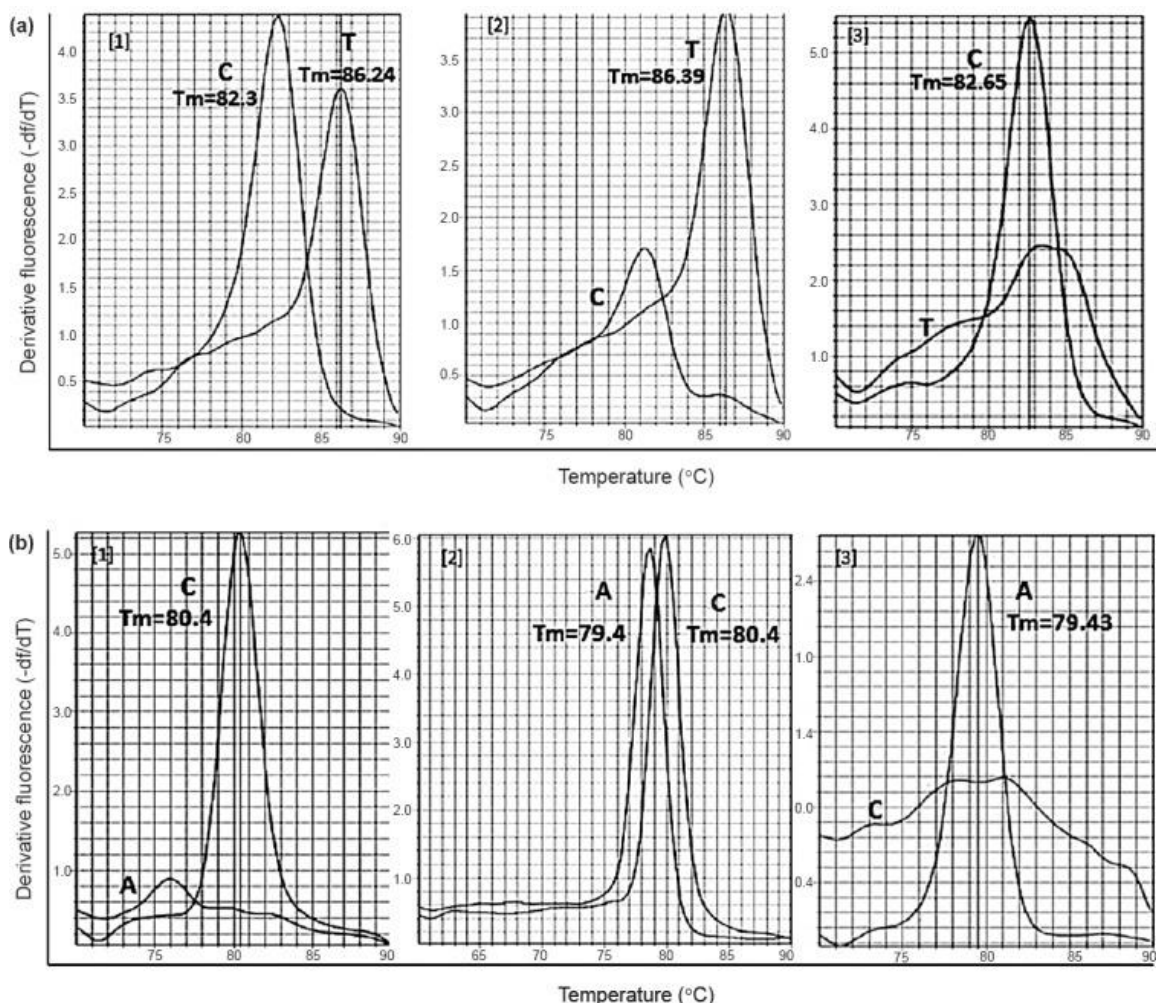


FIG. 1. The principle of the method.

ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ DNA (SNPs)

Μία από τις σημαντικότερες αναλύσεις στη Μοριακή Βιολογία αποτελεί η μελέτη των πολυμορφισμών του DNA και συγκεκριμένα των SNPs (πολυμορφισμοί μονήρους νουκλεοτιδίου, single nucleotide polymorphisms) [345]. Οι SNPs είναι οι συχνότεροι πολυμορφισμοί που οδηγούν σε φαινοτυπικές αλλαγές μεταξύ των ατόμων και αποτελούν την ύπαρξη αλλαγής μιας βάσης στην αλληλουχία του DNA μεταξύ των ατόμων ενώ έχουν μελετηθεί σχετικά με την συμμετοχή τους στην εμφάνιση μιας νόσου σε αρκετές νοσολογικές οντότητες [345]. Υπάρχουν ποικίλες μεθοδολογίες για την ανάλυση των SNPs που διαφέρουν ανάλογα με το κόστος, τη διάρκεια της ανάλυσης και την ακρίβειά τους, και ενώ αρκετά συχνή ήταν στο παρελθόν η αξιολόγηση των SNPs με τη μέθοδο TaqMan, μια εναλλακτική μέθοδος είναι η αξιολόγησή τους με τη βοήθεια της PCR και καμπύλης τήξης κατά τις τελευταίες δεκαετίες καθώς είναι περισσότερο οικονομικά αποδοτική [346-348]. Συγκεκριμένα, στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται ένα ζεύγος forward εκκινητών ειδικών για κάθε αλλήλιο του πολυμορφισμού και ένας κοινός reverse εκκινητής, τα μόρια DNA ενισχύονται με PCR και μετά την αντίδραση του πολυμερισμού τα ενισχυμένα προϊόντα τήκονται και ταυτοποιούνται βάσει της διαφορετικής μορφής της καμπύλης τήξης τους, που οφείλεται στην παρουσία του πολυμορφισμού (καθώς επηρεάζεται από το λόγο GC/AT ratio, το μήκος και την αλληλουχία του μελετούμενου μοριακού στόχου) (Εικόνα 13) [348, 349].

Εικόνα 13: Παράδειγμα καμπύλης τήξης για τη μελέτη πολυμορφισμών DNA [346].

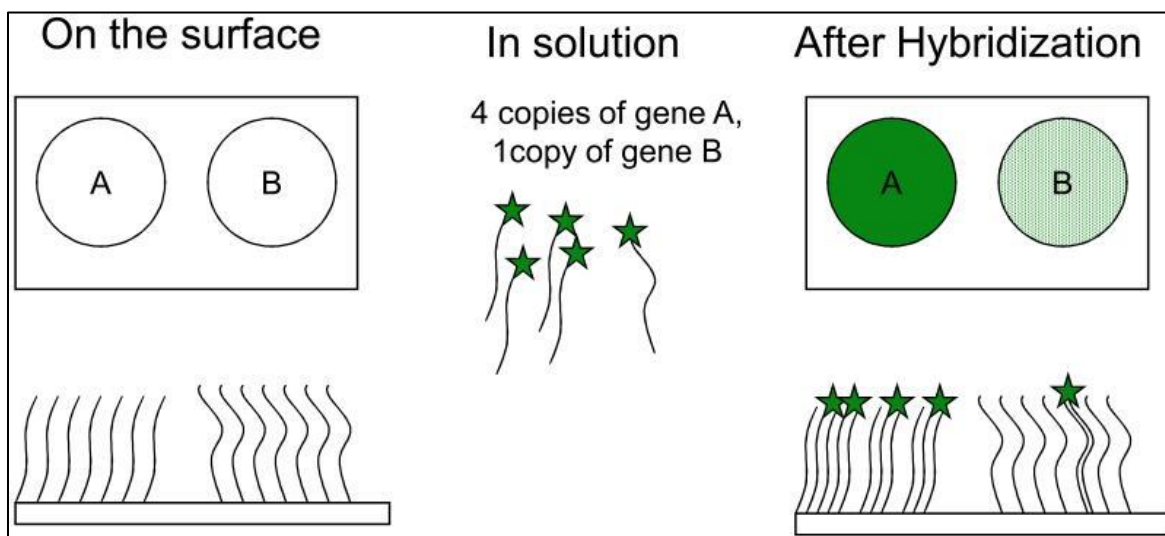


ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

Οι μικροσυστοιχίες (microarrays) είναι μια πολύτιμη εργαστηριακή τεχνική κατά την οποία ταυτόχρονα μπορεί να γίνει η ανίχνευση διάφορων μορίων γενετικού υλικού στο ίδιο πείραμα στηριζόμενη στην αρχή του υβριδισμού και της συμπληρωματικότητας των μορίων DNA, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα [350]. Συγκεκριμένα, σε μια σταθερή γυάλινη επιφάνεια (chip) εναποτίθενται γνωστές αλληλουχίες DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, εν συνεχεία τα υπό μελέτη άγνωστα μόρια DNA τέμνονται με ένζυμα περιορισμού που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες και τα παραγόμενα προϊόντα υβριδοποιούνται στη συμπληρωματική τους θέση στα microchip με την παρουσία κατάλληλων αντιδραστηρίων για την ανάλυση [351]. Μάλιστα, η παρουσία φθορίζουσας χρωστικής διευκολύνει την τεχνική καθώς η πρόσδεσή της στα παραγόμενα τμήματα του γενετικού υλικού βοηθά την αναγνώρισή τους καθώς ανιχνεύονται από δέσμη laser ενώ το σήμα του φθορισμού αναλύεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή με συνέπεια την ταυτοποίηση των μορίων DNA (Εικόνα 14) [351]. Τέλος, υπογραμμίζεται η σπουδαιότητα της συγκεκριμένης τεχνικής για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων (mRNA), πράγμα

που επιτυγχάνεται μέσω της δημιουργίας του cDNA των εν λόγω μορίων και διενέργειας του πειράματος όπως περιγράφηκε παραπάνω [351, 352].

Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής των μικροσυτοιχιών [353].



5. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Στο σημείο αυτό, μετά την περιγραφή των βασικότερων εργαστηριακών τεχνικών ανάλυσης των βιοδεικτών, θα δοθεί έμφαση στους κυκλοφορούντες βιοδείκτες του καρδιαγγειακού συστήματος περιγράφοντας τα βασικά τους χαρακτηριστικά, τις συνηθέστερες μεθοδολογίες/αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού τους, την κλινική τους αξία και τους περιορισμούς από τη χρήση τους, παραθέτοντας τα ευρήματα των σημαντικότερων μελετών. Συγκεκριμένα, θα γίνει περιγραφή για τους κυκλοφορούντες βιοδείκτες που έχουν λάβει έγκριση για μέτρηση στον άνθρωπο, και παράλληλα, θα περιγραφούν βιοδείκτες που βρίσκονται ακόμη σε ερευνητικό επίπεδο, εξετάζονται ως προς την αποτελεσματικότητά τους για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία των καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Νατριουρητικά πεπτίδια (BNP, NT-proBNP)

Τα νατριουρητικά πεπτίδια ανήκουν σε μια κατηγορία ορμονών που συμμετέχουν στη ρύθμιση ποικίλων φυσιολογικών δράσεων στο καρδιαγγειακό σύστημα, ωστόσο έχουν εξέχουσα θέση στην καρδιακή ανεπάρκεια (παρότι συμμετέχουν και σε άλλες παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως η αθηροσκλήρυνση και η αρτηριακή υπέρταση) και είναι τα εξής: το κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο (ANP), το B-τύπου (BNP) και C-τύπου νατριουρητικό πεπτίδιο [46, 354]. Στο σημείο αυτό θα περιγραφεί το BNP και το N-τελικό proBNP (NT-proBNP) που αποτελούν τα συνηθέστερα μετρούμενα νατριουρητικά πεπτίδια με κλινική σημασία για τον άνθρωπο.

Το BNP είναι ένα πεπτίδιο 32 αμινοξέων που εκκρίνεται από τις κοιλίες του μυοκαρδίου λόγω υπερφόρτισης πίεσης ή όγκου (εξαιτίας της ενεργοποίησης των νευροορμονικών μηχανισμών) από την πρόδρομη μορφή preproBNP (πεπτίδιο 134 αμινοξέων που απελευθερώνεται από τα μυοκαρδιακά κύτταρα) [46]. Μάλιστα, το pro-BNP αποδομείται στο BNP (που αποτελεί το C-τελικό τμήμα) και στο N-τελικό proBNP (πεπτίδιο 76 αμινοξέων) σε αναλογία 1:1 με τη βοήθεια ενζύμων [46, 355]. Ωστόσο, το NT-proBNP δεν έχει κάποια γνωστή βιολογική δράση και κυκλοφορεί σε μεγαλύτερες τιμές από το BNP, πιθανώς λόγω μακρύτερης παραμονής του στην κυκλοφορία [356]. Συγκεκριμένα, το BNP έχει ημίσεια ζωή 22 λεπτά στο αίμα σε αντίθεση με το NT-proBNP που έχει 60-120 λεπτά [357]. Το BNP αποδομείται από την νεπριλυσίνη (και από άλλα ένζυμα), γεγονός που έχει συντελέσει στην προσπάθεια αναστολής αυτών των ενζύμων για θεραπευτικούς σκοπούς ή εργαστηριακής σύνθεσης νατριουρητικών πεπτιδίων ώστε να μεγιστοποιηθούν τα θεραπευτικά οφέλη από τη δράση τους ειδικά σε κλινικές καταστάσεις όπως η καρδιακή ανεπάρκεια [358-360]. Η παραγωγή των νατριουρητικών πεπτιδίων οδηγεί φυσιολογικά σε αύξηση της νατριούρησης και στην αγγειοδιαστολή ως μια προσπάθεια για αντιστροφή των αυξημένων πιέσεων πλήρωσης εντός των κοιλιών, της ενεργοποίησης του άξονα RAAS και του συμπαθητικού συστήματος, γεγονός που είναι ωφέλιμο σε καταστάσεις αιμοδυναμικής επιβάρυνσης του μυοκαρδίου όπως στην καρδιακή ανεπάρκεια και την αρτηριακή υπέρταση [361, 362]. Το BNP σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προστατεύει τα μυοκαρδιακά κύτταρα από την απόπτωση, την υπερτροφία και την ίνωση του μυοκαρδίου και συμμετέχει στους μηχανισμούς της φλεγμονής και της προκαλούμενης μυοκαρδιακής αναδιαμόρφωσης μετά από το έμφραγμα του μυοκαρδίου [363, 364]. Παράλληλα, καταστάσεις όπως η υποξία έχουν συνδεθεί με την αύξηση στην παραγωγή του NT-proBNP [365]. Τέλος, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, τα νατριουρητικά πεπτίδια συμμετέχουν στις διαδικασίες της αναπνοής στα μιτοχόνδρια και ενισχύουν την οξείδωση

των λιπαρών οξέων γεγονός που έχει σημασία για τη διαχείριση της ενέργειας στην καρδιακή ανεπάρκεια [366].

Όσον αφορά τον εργαστηριακό προσδιορισμό τους, τα BNP και NT-proBNP προσδιορίζονται με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων, και με τη χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων μπορούν να διακριθούν οι μεταξύ τους αντιγονικές διαφορές, συνεπώς να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους, αν και οι αναλυτικές μέθοδοι επηρεάζονται από την παρουσία γλυκοζυλιωμένων μορφών τους [367-369]. Επιπλέον, το BNP μετράται μετά από αιμοληψία και τοποθέτηση του αίματος σε φυαλίδιο με ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ενώ το NT-proBNP μετράται με αιμοληψία από τον ορό του αίματος και όσον αφορά τις συνθήκες φύλαξής τους, σημειώνεται ότι το BNP είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι 24 ώρες ενώ από την άλλη το NT-proBNP είναι σταθερό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και μπορεί να φυλαχθεί στους -80 βαθμούς Κελσίου μέχρι ένα έτος [370]. Ακόμη, αναλυτικές τεχνικές point-of-care έχουν δημιουργηθεί ώστε να διευκολυνθούν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις των νατριουρητικών πεπτιδίων σε ικνοποιητικό χρονικό διάστημα ειδικά σε καταστάσεις όπου χρειάζεται άμεση γνώση των τιμών τους (πχ. εκτίμηση σε επείγουσες καταστάσεις οξείας δύσπνοιας σε τμήματα επειγόντων) [371]. Επιπλέον, ορισμένες αναλυτικές μέθοδοι παρέχουν διαφορετικά όρια αναφοράς ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και τη νεφρική λειτουργία [372].

Τα νατριουρητικά πεπτίδια έχουν κυρίαρχη θέση για τον αποκλεισμό της οξείας καρδιακής ανεπάρκειας σε επείγουσες καταστάσεις οξείας δύσπνοιας σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, καθώς τιμές μικρότερες από τα καθιερωμένα διαγνωστικά κατώφλια (BNP<100 pg/ml και NT-proBNP <300 pg/mL) απομακρύνουν από τη διάγνωση της καρδιακής ανεπάρκειας (τα διαγνωστικά αυτά όρια ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία και την παρουσία κολπικής μαρμαρυγής) [364, 373-375]. Από την άλλη, για τον αποκλεισμό της χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας τα διαγνωστικά κατώφλια έχουν χαμηλότερες τιμές (BNP<35 pg/ml και NT-proBNP<125 pg/ml) [376]. Ωστόσο, οι τιμές των νατριουρητικών πεπτιδίων είναι μειωμένες στην παχυσαρκία και αυξημένες σε κλινικές καταστάσεις όπως η κολπική μαρμαρυγή, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, οι μυοκαρδιοπάθειες, η αμυλοείδωση, οι βαλβιδοπάθειες, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η πνευμονική εμβολή, η πνευμονική υπέρταση και η σήψη, και για το λόγο αυτό οι τιμές τους θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή [362, 377]. Ακόμη, θα πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχει μεταβλητότητα όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών ατόμων αλλά και μεταξύ του ίδιου ατόμου σχετικά με την έκφραση του BNP γεγονός που συμβαίνει σε υγιείς αλλά και σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια [362].

Παρόλα αυτά, οι τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες προτείνουν με ένδειξη Ι τη μέτρηση των νατριουρητικών πεπτιδίων για τη διάγνωση της καρδιακής ανεπάρκειας, την εκτίμηση της βαρύτητάς της και τον καθορισμό της πρόγνωσης των ασθενών [378]. Η σπουδαιότητα των νατριουρητικών πεπτιδίων φαίνεται από την ένταξή τους στα κριτήρια των κλινικών μελετών ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια [379]. Μάλιστα, πληρούν αρκετά από τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού βιοδείκτη για την καρδιακή ανεπάρκεια καθώς έχουν προγνωστική ικανότητα, διευκολύνουν τη διάγνωση της καρδιακής ανεπάρκειας ειδικά σε περιπτώσεις αμφιβολίας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια ανεξάρτητα από το κλάσμα εξώθησης, έχουν ικανοποιητική ειδικότητα και ευαισθησία, επικυρωμένα διαγνωστικά κατώφλια, η μέτρησή τους είναι αναπαραγώγιμη, οικονομικά αποδοτική και υπάρχουν δεδομένα από κλινικές μελέτες σχετικά με την επίδραση των θεραπειών στα επίπεδά τους [380].

Galectin-3

Η galectin-3 είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των λεκτινών, οι οποίες προσδένονται στη β-γαλακτοσιδάση, και συμμετέχει σε αρκετές βιολογικές διαδικασίες όπως η φλεγμονή, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, οι διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, οι αλληλεπιδράσεις κυττάρων και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η απόπτωση, η αγγειογένεση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, το μάτισμα του pre-mRNA, οι ανοσολογικοί μηχανισμοί και η ίνωση σε ποικίλλα όργανα [381-383]. Η galectin-3 στον άνθρωπο είναι μια πρωτεΐνη 35 kDa που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LGALS3* που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, παρόλα αυτά μετακινείται μέσα στον πυρήνα, μπορεί να εντοπισθεί στην κυτταρική επιφάνεια και μπορεί να εκκριθεί στον εξωκυττάριο χώρο και στα βιολογικά υγρά όπως τα ούρα και το αίμα [383, 384]. Η διαφορετική εντόπιση ως προς τα κυτταρικά διαμερίσματα δικαιολογεί και την ποικιλία των δράσεων της σε μοριακό επίπεδο και τη συμμετοχή της σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως η φλεγμονή, η μετάσταση, η ανοσολογική απάντηση αλλά και η συσχέτισή της με μια σειρά κλινικών καταστάσεων όπως η νεφρική νόσος, οι καρδιαγγειακές νόσοι, τα κακοήγη νοσήματα, το άσθμα, η γαστρίτιδα και η παχυσαρκία [381, 384].

Αναλυτικότερα για το καρδιαγγειακό σύστημα, η galectin-3 συμμετέχει στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης μέσω των μηχανισμών της φλεγμονής, της προσέλευσης μονοκυττάρων/μακροφάγων, της ενεργοποίησης των μακροφάγων και της ενδοκυττάρωσης των λιπιδίων (φαγοκυττάρωση), της ενεργοποίησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της προσέλευσης των ανοσολογικών κυττάρων [385]. Μάλιστα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η galectin-3 εμπλέκεται στη δημιουργία αποτιτανώσεων εντός των αθηρωματικών πλακών λόγω της χρόνιας φλεγμονής, που αποτελούν χαρακτηριστικό της ευάλωτης αθηρωματικής πλάκας [386]. Η galectin-3 συμμετέχει στην εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στην ίνωση μετά από κάποιο επιβλαβή παράγοντα που προσβάλλει το μυοκάρδιο (πχ. έμφραγμα του μυοκαρδίου) μέσω της ενεργοποίησης των ινοβλαστών και της παραγωγής κολλαγόνου που επάγει την διαστολική δυσλειτουργία του μυοκαρδίου, κυρίαρχο χαρακτηριστικό της καρδιακής ανεπάρκειας [387]. Συγκεκριμένα, η galectin-3 εκφράζεται σε χαμηλές τιμές στο φυσιολογικό μυοκάρδιο, ωστόσο, στην καρδιακή ανεπάρκεια αρχικά παράγεται ως μια προσπάθεια αντιρρόπησης ασκώντας αντιαποπτωτικές δράσεις, παρόλα αυτά προοδευτικά συμμετέχει στην μυοκαρδιακή υπερτροφία και στην αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου [388, 389]. Τέλος, άλλα ερευνητικά δεδομένα παρουσιάζουν τη συσχέτισή της με την ινωτική μυοκαρδιοπάθεια των κόλπων που εμπλέκεται στην έναρξη και διατήρηση της κολπικής μαρμαρυγής [390].

Η galectin-3 είναι ένας σταθερός βιοδείκτης που δεν παρουσιάζει μεταβολή σε σχέση με το κirkάδιο ρυθμό και δεν μεταβάλλεται με την ηλικία, το δείκτη μάζας σώματος και το φύλο [391, 392]. Μάλιστα, εν αντιθέσει με τα νατριουρητικά πεπτίδια, εξαρτάται λιγότερο από τις αιμοδυναμικές συνθήκες φόρτισης του μυοκαρδίου και αντανakλά κυρίως την ίνωση, γεγονός που προσδίδει ενδιαφέρον ως πιθανό βιοδείκτη για την καρδιακή ανεπάρκεια [393]. Η αξιολόγησή του γίνεται από δείγμα ορού με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων και συνηθέστερα ELISA [394]. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης αυτοματοποιημένα συστήματα μέτρησής της (ARCHITECT) που είναι οικονομικά αποδοτικά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για νοσοκομειακή χρήση [395, 396]. Ακόμη, υπάρχουν όρια αναφοράς για τη χρόνια και την οξεία καρδιακή ανεπάρκεια ενώ σημειώνεται ότι ο βιοδείκτης μπορεί να αποθηκευθεί στους -70 βαθμούς Κελσίου για τουλάχιστον έξι μήνες για μελλοντική χρήση [397].

Η χρήση της galectin-3 έχει μελετηθεί ιδιαίτερα για πιθανή χρήση της στην καρδιακή ανεπάρκεια και σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες των American Heart

Association/American College of Cardiology (AHA/ACC) του 2017, έχει ένδειξη IIb για τη σταδιοποίηση του κινδύνου και την εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια [398]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι τιμές της galectin-3 > 17.8 ng/mL έχουν συσχετισθεί με δυσμενέστερη πρόγνωση των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και μπορούν να προβλέψουν τους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια που θα εμφανίσουν πρόοδο του συνδρόμου, μελλοντικές νοσηλείες για απορρύθμιση καρδιακής ανεπάρκειας ή θάνατο [399]. Παρομοίως, η επιμονή των αυξημένων τιμών galectin-3 μακροχρονίως μπορεί να αναδείξει τους ασθενείς που θα χρειασθούν επιπλέον ενίσχυση της θεραπευτικής αγωγής τους [399]. Ακόμη, η galectin-3 μπορεί να προσφέρει επιπρόσθετες πληροφορίες συνεκτιμώμενη με τα νατριουρητικά πεπτίδια στα πλαίσια μιας στρατηγικής αξιολόγησης πολλαπλών βιοδεικτών [400]. Επιπλέον, η προγνωστική ικανότητα της galectin-3 για δυσμενή επιβίωση έχει παρουσιασθεί και σε ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου [401]. Τέλος, υπάρχουν προσπάθειες που αποσκοπούν σε ερευνητικό επίπεδο στη δημιουργία μορίων που εμποδίζουν τις δράσεις της galectin-3 με σκοπό τη θεραπεία και την αντιμετώπιση της ίνωσης [383].

sST2

Ο sST2 (soluble suppression of tumorigenicity 2) ανήκει στην οικογένεια του υποδοχέα της IL-1 και έχει δύο μορφές: τον διαλυτό (sST2) και τον διαμεμβρανικό ST2 (ST2L) που ασκούν διαφορετικούς ρόλους [402]. Ο sST2 παράγεται από το χρωμόσωμα 2q12 όπου εντοπίζεται το γονίδιο ST2 και έχει δύο υποκινητές (τον εγγύς και τον άπω) που επηρεάζουν την έκφραση του sST2 ή του ST2L [402, 403]. Ο sST2 παράγεται τόσο από τα μυοκαρδιακά κύτταρα ως απάντηση στο στρες αλλά και από εξωκαρδιακούς ιστούς [404]. Κυρίαρχη είναι η συμμετοχή του στους μηχανισμούς της φλεγμονής και συγκεκριμένα στη λειτουργία των μαστοκυττάρων, των T βοηθητικών κυττάρων και στην παραγωγή κυτταροκινών από τα T βοηθητικά κύτταρα [405]. Χαρακτηριστικά, συμμετέχει στην παθοφυσιολογία διάφορων αυτοάνοσων και φλεγμονωδών νοσημάτων (πχ. ρευματοειδής αρθρίτιδα, άσθμα, παρασιτικές λοιμώξεις, κολλαγονοπάθειες, κακοήθη νοσήματα) [405]. Ειδικά για το καρδιαγγειακό σύστημα, η πρόσδεση της IL-33 στον ST2L οδηγεί στον περιορισμό της μυοκαρδιακής υπερτροφίας και της ίνωσης ενώ από την άλλη ο sST2 απομακρύνει την IL-33 και μεσολαβεί στις δράσεις της υπερτροφίας και της ίνωσης στο μυοκάρδιο [402]. Λόγω της συμμετοχής του στους μηχανισμούς της φλεγμονής, ο sST2 εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της καρδιακής ανεπάρκειας [402]. Επιπλέον, συμμετέχει στους μηχανισμούς της αναδιαμόρφωσης μετά από το έμφραγμα του μυοκαρδίου ως απάντηση στο μυοκαρδιακό στρες και τη μυοκαρδιακή βλάβη [406]. Ακόμη, έχει τεκμηριωθεί η συσχέτισή του με τους δείκτες hs-CRP και IL-6 που είναι στοιχεία της χρόνιας φλεγμονής στην αθηρωμάτωση [407].

Όσον αφορά τον εργαστηριακό του προσδιορισμό, ο sST2 μετράται εργαστηριακά με ανοσοενζυμικές μεθόδους και συγκεκριμένα με ELISA σε δείγματα ορού και πλάσματος, μπορεί να μείνει σταθερός για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και μπορεί να διατηρηθεί στους -80 βαθμούς Κελσίου για μελλοντική μέτρηση [408]. Υπάρχουν διάφορα kit ELISA για τη μέτρηση του βιοδείκτη που διαφέρουν ως προς τα όρια αναφοράς μεταξύ τους [409]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα όρια του sST2 δεν μεταβάλλονται σε σχέση με την ηλικία και είναι υψηλότερα για τους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες [410]. Παρόλα αυτά, οι τιμές του sST2 δεν αυξάνονται μόνο στην καρδιακή ανεπάρκεια αλλά και σε άλλες καταστάσεις όπως η σήψη, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η πνευμονία, ενώ δεν μεταβάλλονται στη νεφρική ανεπάρκεια [408].

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο sST2 έχει προγνωστική ικανότητα για τους ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα και σε ασθενείς με οξεία νόσο [411]. Επιπλέον, τα επίπεδά του παρουσιάζουν αντίστροφη συσχέτιση με το κλάσμα εξώθησης [406]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο sST2 είναι αυξημένος στην οξεία καρδιακή ανεπάρκεια και έχει προγνωστική ικανότητα για μελλοντική θνητότητα στον ένα χρόνο και, μάλιστα, η προγνωστική του ικανότητα αυξάνεται όταν εκτιμάται μαζί με το NT-proBNP [412]. Χαρακτηριστικά, τιμές sST2 ≥ 35 ng/ml θεωρούνται το κατώφλι για δυσμενή επιβίωση και θνητότητα [413]. Επιπλέον, άλλα δεδομένα παρουσιάζουν ότι η εκτίμηση του sST2 ανά τακτά διαστήματα προσδίδει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση των ασθενών μετά από οξεία καρδιακή ανεπάρκεια, τόσο κατά την αρχική εκτίμηση των ασθενών όσο και κατά τη νοσηλεία τους, ενώ τα επίπεδά του τείνουν να βελτιώνονται μετά από χορήγηση θεραπείας [414]. Παράλληλα, τιμές sST2 > 36.3 ng/ml για τους ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση και μπορούν να αυξήσουν την προγνωστική ικανότητα των νατριουρητικών πεπτιδίων [415]. Ο διπλασιασμός των τιμών του sST2 σύμφωνα με άλλη μελέτη σχετίστηκε με τον κίνδυνο για καρδιαγγειακή θνητότητα, θνητότητα από κάθε αιτία ή μελλοντικές νοσηλείες [416]. Η αξιολόγηση του sST2 στην καρδιακή ανεπάρκεια είναι χρήσιμη καθώς αντανakλά διαφορετικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς του συνδρόμου από τα νατριουρητικά πεπτίδια και συνεπώς μπορεί να προσφέρει επιπρόσθετες πληροφορίες [416]. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες για την καρδιακή ανεπάρκεια, των ACC/AHA ο sST2 έχει χαμηλή ένδειξη (IIb) για τη σταδιοποίηση του κινδύνου των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια [417].

Τροπονίνη

Η τροπονίνη είναι ένα σύνθετο πρωτεϊνικό σύμπλοκο που εντοπίζεται στα μυοκαρδιακά κύτταρα και στους σκελετικούς μύες και αποτελείται από τρεις υπομονάδες: την τροπονίνη I, T και C ενώ συμμετέχει στο μηχανισμό της συστολής του μυοκαρδίου και στη διαχείριση των ιόντων ασβεστίου [418]. Η τροπονίνη T αλληλεπιδρά με την τροπομυοσίνη, η τροπονίνη C προσδένεται στα ιόντα ασβεστίου και η τροπονίνη I αναστέλει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ακτίνη και τη μυοσίνη επί απουσίας ιόντων ασβεστίου στη διαστολή [419]. Οι υπομονάδες T και I έχουν διαφορές στην αμινοξική τους αλληλουχία ανάλογα με την προέλευση του ενζύμου (μυοκάρδιο ή σκελετικοί μύες) με συνέπεια να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως περισσότερο ειδικοί μυοκαρδιακοί δείκτες βλάβης και νέκρωσης εν αντιθέσει με την τροπονίνη C [420]. Παρόλα αυτά, η τροπονίνη I και T μπορούν να αυξηθούν μετά από φυσιολογικές συνθήκες (πχ. άσκηση, στρες) αλλά και σε ποικίλλες παθολογικές καταστάσεις (πχ. πνευμονική εμβολή, περικαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, μυοκαρδιοπάθειες, καρδιακή ανεπάρκεια, χορήγηση καρδιοτοξικών παραγόντων, αρρυθμίες, νεφρική ανεπάρκεια, μετά από καρδιακό χειρουργείο και στη σήψη) που επίσης σχετίζονται με την πρόκληση μυοκαρδιακής βλάβης [420, 421].

Η απελευθέρωση των τροπονινών από τα μυοκαρδιακά κύτταρα οφείλεται σε ποικίλους λόγους: απόπτωση μυοκαρδιακών κυττάρων, μυοκαρδιακή νέκρωση, αυξημένη διαπερατότητα των μυοκαρδιακών μεμβρανών όπως συμβαίνει κατά την ισχαιμία, ανανέωση των μυοκαρδιακών κυττάρων και πρωτεολυτική διάσπαση των τροπονινών [422]. Σημειώνεται ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής των τροπονινών κυμαίνεται από 1-2 ώρες [423]. Επιπλέον, υπάρχει μια μικρή μεταβλητότητα των τιμών εντός του 24 ωρου για κάθε

άτομο όπως και μεταξύ βραχέων επαναλαμβανόμενων μετρήσεων γεγονός που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη [424]. Παρόλα αυτά στο έμφραγμα του μυοκαρδίου οι τιμές των τροπονινών παραμένουν υψηλές μετά από ημέρες και ακολουθούν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο απελευθέρωσης [425].

Οι τροπονίνες έχουν κυρίαρχη θέση για τη διάγνωση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων, ωστόσο, λόγω της αύξησής τους και σε άλλες κλινικές καταστάσεις θα πρέπει να ερμηνεύονται πάντα σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα των ασθενών και την παρουσία εκδηλώσεων ισχαιμίας [421]. Σύμφωνα με τον 4^ο Παγκόσμιο Ορισμό για το Έμφραγμα του Μυοκαρδίου (Universal Definition of Myocardial Infarction) του 2018, βάσει του οποίου ταξινομούνται τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, συστήνεται η χρήση των ανοσολογικών μεθόδων υψηλής ευαισθησίας για τη μέτρηση των τροπονινών (high-sensitivity assays) ώστε να ανιχνευθούν οι πρώιμες αυξήσεις των μυοκαρδιακών ενζύμων όσο πιο άμεσα γίνεται μετά την προσέλευση του ασθενούς στα επείγοντα και μετά από 1-3 ώρες ώστε να βελτιστοποιηθεί η πρόγνωση των ασθενών μετά από έγκαιρη αντιμετώπιση και θεραπεία [420]. Πέρα από την ίδια την τιμή της τροπονίνης αξιολογούνται οι μεταβολές της και συγκεκριμένα το εάν υπάρχουν σταθερά επίπεδά της ή εάν υπάρχει δυναμική μεταβολή των τιμών της (άνοδος και πτώση), και επιπλέον ελέγχεται η παρουσία σημείων ισχαιμίας και κλινικές παράμετροι [420]. Συγκεκριμένα, επί παρουσίας σταθερών τιμών τροπονίνης η μυοκαρδιακή βλάβη είναι σταθερή, επί παρουσίας τιμών πάνω από το ανώτερο εκατοστημόριο η μυοκαρδιακή βλάβη θεωρείται εξελισσόμενη ενώ η άνοδος και πτώση των τιμών αποδίδεται σε οξεία μυοκαρδιακή βλάβη [420]. Επίσης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η χρονική στιγμή προσέλευσης των ασθενών κατά την αρχική αιμοληψία σε σχέση με τον πόνο [425]. Τέλος, η χρήση των τροπονινών υψηλής ευαισθησίας έχουν αντικαταστήσει την κρεατινική κινάση που εκφράζεται στο μυοκάρδιο (CK-MB) για τη διάγνωση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [425].

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ESC προτείνονται οι αλγόριθμοι μέτρησης στο χρόνο μηδέν (κατά την προσέλευση των ασθενών) και στη μία ή στις δύο ώρες επαναληπτικά, ώστε να γίνει ο αποκλεισμός ή η επιβεβαίωση του NSTEMI, ενώ τα όρια αναφοράς καθορίζονται ανάλογα με την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται [426]. Οι τιμές τροπονίνης κάτω από το 99^ο εκατοστημόριο θεωρούνται φυσιολογικές, παρόλα αυτά υπογραμμίζεται ότι η χρήση των αναλυτικών τεχνικών υψηλής ευαισθησίας έχει ως μειονέκτημα την χαμηλότερη ειδικότητα και ως εκ τούτου την ανίχνευση θετικού τεστ λόγω καρδιακής παθολογίας (πλην της ισχαιμικής νόσου) ή μη-καρδιακής νόσου [427, 428]. Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η σύγκριση των αποτελεσμάτων των ασθενών όπου έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές αναλυτικές μέθοδοι δεν είναι εφικτή λόγω των διαφορών στα όρια αναφοράς [429]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι πιθανοί παράγοντες που μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τις τροπονίνες κατά την αναλυτική αξιολόγηση είναι οι ενδογενείς ανοσοσφαιρίνες με αποτέλεσμα την αύξηση ή τη μείωση των τιμών τους [430].

Τέλος, πέρα από τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, η μέτρηση της τροπονίνης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για δυσμενή επιβίωση και για άλλες καταστάσεις όπως στους ασθενείς με μυοκαρδίτιδα, με καρδιακή ανεπάρκεια, σακχαρώδη διαβήτη και στην κολπική μαρμαρυγή [431-434].

Μυοσφαιρίνη, Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), Οξαλοξική τρανσαμινάση (SGOT), Πυροσταφυλική τρανσαμινάση (SGPT), Κρεατινική κινάση-Καρδιακό Ισοένζυμο (CK-MB)

Οι βιοδείκτες αυτοί θα περιγραφούν μαζί καθώς αυξάνονται στα πλαίσια μυοκαρδιακής βλάβης (χωρίς να είναι ειδικοί για το μυοκάρδιο), ωστόσο, η χρήση τους ειδικά για τη διάγνωση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων έχει μειωθεί λόγω της χρήσης της τροπονίνης υψηλής ευαισθησίας.

Η **μυοσφαιρίνη** είναι μια αιμοπρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των μυοκαρδιακών κυττάρων και των σκελετικών μυών και παρουσιάζει μια θέση σύνδεσης με το οξυγόνο με συνέπεια τη συμμετοχή της στην ανταλλαγή οξυγόνου μεταξύ των ιστών [435]. Είναι ο πρώτος βιοδείκτης που απελευθερώνεται μετά από την πρόκληση ισχαιμικής βλάβης στο μυοκάρδιο στο έμφραγμα (ανιχνεύεται στο αίμα στα 30 λεπτά από την έναρξη της βλάβης), τα επίπεδά του είναι μέγιστα στις 12 ώρες μετά το έμφραγμα και απεκκρίνεται στις 24 ώρες από τους νεφρούς, ωστόσο δεν είναι ειδικός για το μυοκάρδιο και για το λόγο αυτό έχει εγκαταλειφθεί ως βιοδείκτης για τη διάγνωση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [5, 436]. Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, μαζί με την τροπονίνη T και τη CK-MB μπορούν να διακρίνουν τους ασθενείς που επισκέπτονται τα τμήματα επειγόντων με διάγνωση NSTEMI, ενώ άλλες μελέτες έχουν παρουσιάσει προγνωστική ικανότητα της μυοσφαιρίνης για δυσμενή επιβίωση μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο [437, 438]. Επίσης, οι τιμές της αυξάνονται στις μυοπάθειες και στις μυοκαρδιοπάθειες και είναι πολύ υψηλές στη ραβδομύωση ενώ η μυοσφαιρίνη μπορεί επίσης να μετρηθεί και στα ούρα (μυοσφαιρινουρία) [439]. Η μυοσφαιρίνη μετράται σε δείγματα ορού με τη βοήθεια ανοσολογικών μεθόδων και συνηθέστερα με τη μέθοδο ELISA με ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα [440, 441].

Η **γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)** είναι ένα ένζυμο που εκφράζεται στο μυοκάρδιο, τους σκελετικούς μύες, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και άλλα κύτταρα όπως τα καρκινικά κύτταρα (συνολικά έχει 5 ισομορφές) [442]. Το ισοένζυμο LDH1 εκφράζεται στο μυοκάρδιο ωστόσο δεν είναι ειδικός δείκτης και όσον αφορά την κινητική του στο έμφραγμα του μυοκαρδίου, αυξάνεται τις πρώτες 6-12 ώρες από την έναρξη του πόνου, μεγιστοποιείται στις 1-3 ημέρες και οι τιμές του ομαλοποιούνται στις 8-14 ημέρες [443, 444]. Παρόλα αυτά, λόγω της χαμηλής της ειδικότητας για το μυοκάρδιο η LDH δε χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης για τη διάγνωση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων καθώς έχει υποκατασταθεί από τη χρήση των τροπονινών υψηλής ευαισθησίας [5, 443]. Η μέτρηση της LDH έχει ευρείες εφαρμογές όπως για παράδειγμα κατά την αξιολόγηση της παρουσίας αιμόλυσης αλλά και στην παρακολούθηση των κακόηθων νεοπλασιών ως δείκτης του καρκινικού φορτίου [445]. Η μέτρηση της LDH γίνεται σε (μη-αιμολυμένο) δείγμα ορού και η αναγνώριση των ισομορφών της επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ανοσοχημικών μεθόδων ή με ηλεκτροφόρηση σε άγαρ [446].

Η **κρεατινική κινάση** είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή της κρεατίνης με ATP σε φωσφοκρεατίνη και ADP (που αποτελεί μια πηγή ενέργειας για το κύτταρο) και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ή τα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών και του μυοκαρδίου δημιουργώντας διμερείς ή οκταμερείς μορφές [447]. Η ισομορφή της κρεατινικής κινάσης που εκφράζεται στο μυοκάρδιο, η οποία είναι γνωστή ως CK-MB, είναι ένα διμερές ένζυμο που αποτελείται από τις υπόμονάδες M και B, ωστόσο, εκφράζεται και σε άλλους ιστούς και σε καταστάσεις όπως τα φλεγμονώδη νοσήματα, τα κακοήθη νοσήματα, ο υποθυρεοειδισμός, το τραύμα και μετά από καρδιακές και μη-καρδιακές επεμβάσεις [448]. Στο έμφραγμα του μυοκαρδίου οι τιμές της CK-MB αυξάνονται στις 4-9 ώρες από την έναρξη του πόνου με μέγιστη τιμή εντός 24 ωρών και ομαλοποιούνται σε

48-72 ώρες [449]. Για το λόγο αυτό, η CK-MB δε χρησιμοποιείται ως δείκτης για τη διάγνωση της μυοκαρδιακής βλάβης στο έμφραγμα του μυοκαρδίου καθώς δεν έχει ικανοποιητική ειδικότητα εν αντιθέσει με την τροπονίνη υψηλής ευαισθησίας [5]. Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι αυξημένες τιμές της σχετίζονται με την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας και με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών [450]. Η κρεατινική κινάση και τα ισοένζυμά της μετρώνται με αιμοληψία σε δείγμα ορού (μη-αιμολυμένο δείγμα, ιδανικά μέτρηση εντός ωρών) με τη βοήθεια ανοσοχημικών τεχνικών και ηλεκτροφόρησης (για το διαχωρισμό των ισομορφών της κρεατινικής κινάσης) [451, 452].

Όσον αφορά τα ένζυμα **οξαλοξική τρανσαμινάση (SGOT)** και **πυροσταφυλική τρανσαμινάση (SGPT)**, η χρήση τους για τη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου έχει εγκαταλειφθεί καθώς δεν αποτελούν ειδικό δείκτη για τη διάγνωση της μυοκαρδιακής βλάβης καθώς αυξάνονται σε ηπατικά νοσήματα, στην πνευμονική εμβολή και σε καταστάσεις καταπληξίας [5]. Ειδικά η SGOT αυξάνεται στις 3-4 ώρες μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου, φτάνει τη μέγιστη τιμή στις 15-28 ώρες και τα επίπεδά της υποχωρούν στις 5 ημέρες [453]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυξημένες τιμές των ηπατικών ενζύμων είναι εύρημα της λιπώδους διήθησης του ήπατος, που έχει συσχετισθεί με τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα [454]. Τέλος, τα επίπεδά τους μετρώνται κατά το βιοχημικό έλεγχο ρουτίνας σε δείγματα ορού με τη βοήθεια ενζυμικών μεθόδων [455].

hsCRP

Η αθηρωμάτωση είναι μια φλεγμονώδης διαδικασία (όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα της παθοφυσιολογίας) όπου εξέχουσα θέση κατέχει η οξείδωση των μορίων της LDL χοληστερόλης [456]. Μάλιστα, η μείωση της LDL με τη βοήθεια των φαρμακευτικών μέσων (στατίνες) έχει αναδείξει τις αντιφλεγμονώδεις και πλειοτρόπες δράσεις αυτών των μορίων που σχετίζονται με καλύτερα κλινικά αποτελέσματα για τους ασθενείς με στεφανιαία νόσο [456]. Υπό αυτό το πρίσμα, έχουν γίνει προσπάθειες ώστε να αποσαφηνιστεί εάν διάφορα μόρια που σχετίζονται με τους μηχανισμούς της φλεγμονής όπως η CRP και ειδικά η hsCRP θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς παράγοντες κινδύνου για το καρδιαγγειακό σύστημα και συγκεκριμένα να συσχετισθούν με τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και την πρόκληση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [457]. Ειδικά για την LDL υπογραμμίζεται ότι η χορήγηση υπολιπιδαιμικής αγωγής λαμβάνοντας υπόψη τα αυξημένα επίπεδα CRP θα μπορούσε να σχετίζεται με πιθανά οφέλη από την υπολιπιδαιμική αγωγή, ανεξάρτητα από τις επιτευχθείσες τιμές CRP μετά τη θεραπεία [458]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η hsCRP έχει συσχετισθεί με δυσμενέστερη πρόγνωση και εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων, πολλές φορές προσδίδοντας επιπλέον πληροφορίες από τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου όπως παρουσιάζουν τα ευρήματα των κλινικών μελετών [459]. Επιπλέον, έχει τεκμηριωθεί η συσχέτισή της CRP με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τη ρήξη της ευάλωτης αθηρωματικής πλάκας [460]. Ομοίως, η CRP έχει συσχετισθεί με δυσμενέστερη επιβίωση για τους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη αλλά και με την παρουσία των χαρακτηριστικών του μεταβολικού συνδρόμου [461, 462].

Η CRP ανήκει στην οικογένεια των πεντραξινών (πρωτείνες της ενδογενούς ανοσολογικής απόκρισης) και αποτελείται από 5 υπομονάδες 23kDa με χρόνο ημίσειας ζωής 19 ώρες [463]. Η CRP παράγεται από το χρωμόσωμα 1 (1q23-24) και σύμφωνα με τη

βιβλιογραφία πολυμορφισμοί SNPs έχουν συσχετισθεί με διαφορά στις τιμές της CRP μεταξύ των ατόμων [464]. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού για την CRP, συννηθέστερα χρησιμοποιείται σε δείγμα περιφερικού αίματος η νεφελομετρία και άλλες ανοσοενζυμικές μέθοδοι (πχ. ELISA), ενώ σύμφωνα με τις ACC/AHA συστήνεται η μέτρηση της υψηλής ευαισθησίας CRP (που δίνει τη δυνατότητα μέτρησης και μικρότερων ποσοτήτων CRP που κυκλοφορούν) όπου οι ασθενείς ταξινομούνται σε ασθενείς με χαμηλό, ενδιάμεσο και υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο χρησιμοποιώντας τα διαγνωστικά όρια των 1 και 3mg/L αντίστοιχα [465-468].

Παρόλα αυτά, η CRP δεν αποτελεί ειδικό δείκτη φλεγμονής για το καρδιαγγειακό σύστημα καθώς απελευθερώνεται από το ήπαρ σε ποικίλες καταστάσεις όπως οι λοιμώξεις, τα αυτοάνοσα νοσήματα, οι κακοήθειες, ωστόσο, είναι τεκμηριωμένη η συσχέτιση αυτών των κλινικών καταστάσεων με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο βάσει της βιβλιογραφίας [469, 470]. Η μέτρηση της hsCRP ως πιθανού καρδιαγγειακού παράγοντα κινδύνου δεν έχει τεκμηριωθεί, παρόλα αυτά, θα μπορούσε να μετράται σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου και Framingham risk score 10-20% λαμβάνοντας υπόψη τυχόν συνύπαρξη άλλων φλεγμονωδών νοσημάτων που να δικαιολογούν τις αυξημένες τιμές της [471]. Τέλος, διάφορες προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να καταπολεμηθεί η φλεγμονή ως πιθανός παράγοντας κινδύνου σε μια σειρά κλινικών μελετών με κριτήριο παρακολούθησης τη CRP όπως για παράδειγμα με τη βοήθεια της άσκησης, βιταμινών και καθιερωμένων θεραπειών (πχ. υπολιπιδαιμικοί παράγοντες, αντιαιμοπεταλιακά, αντιδιαβητικοί παράγοντες) [472-474].

Λιπίδια και απολιποπρωτείνες

Είναι γνωστή η σχέση της LDL χοληστερόλης (Εικόνα 15) ως παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών, καθώς η οξείδωση των μορίων LDL (oxLDL) αποτελεί το αρχικό στάδιο για την έναρξη των αθηρωματικών βλαβών υπό τη δράση των παραγόντων κινδύνου, του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής αλλά και έναν στόχο των θεραπειών με τις στατίνες και τα νεότερα υπολιπιδαιμικά φάρμακα (αναστολείς της πρωτεΐνης PCSK9) [475]. Ειδικά για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου, έχουν καθιερωθεί αυστηρά όρια για την LDL χοληστερόλη καθώς οι μελέτες έχουν παρουσιάσει κλινικό όφελος από την παρουσία των χαμηλών τιμών ως προς τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου [476]. Από την άλλη, οι μικρές και πυκνές LDL έχουν προαθηρογόνο δράση, υπόκεινται σε μεγαλύτερη οξείδωση από την LDL και συνεισφέρουν σε αυξημένο κίνδυνο για αθηροσκληρωτική καρδιοπάθεια των ασθενών με υπερτριγλυκεριδαιμία [477]. Υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον υπολειπόμενο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία και LDL εντός των θεραπευτικών στόχων, υποδηλώνοντας την προαθηρογόνο δράση των χυλομικρών και των VLDL ως συστατικών των τριγλυκεριδίων [478]. Ακόμη, υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στα τριγλυκερίδια, τις λιποπρωτείνες που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια και τα υπολείμματα της χοληστερόλης (remnants), με τον κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και τη στένωση της αορτικής βαλβίδας [479]. Για το λόγο αυτό, πέρα από την LDL, έχουν περιγραφεί στις κατευθυντήριες οδηγίες θεραπευτικοί στόχοι για την non-HDL χοληστερόλη με ιδιαίτερα σημαντική την αξιολόγηση της απολιποπρωτεΐνης B (apoB) ως συστατικό αυτών των μορίων, καθώς αποτελεί μια απολιποπρωτεΐνη με ιδιαίτερα αθηρογόνο δράση [476]. Ειδικά για τους ασθενείς με ήπια-μετρία υπερτριγλυκεριδαιμία η μέτρηση της non-HDL είναι περισσότερο αντιπροσωπευτική του καρδιαγγειακού κινδύνου από την εκτίμηση της LDL χοληστερόλης, που συχνά δεν είναι ακριβής [480]. Τέλος, για την Lp(a) (που

αποτελείται από μόρια LDL που συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό με την απολιποπρωτεΐνη (a)) θα πρέπει να σημειωθεί ότι καθορίζεται γενετικά και οι υψηλές της τιμές (≥ 50 mg/dL) έχουν συνδεθεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο και τη στένωση της αορτικής βαλβίδας, ενώ υπάρχουν προσπάθειες στόχευσής της θεραπευτικά με antisense ολιγονουκλεοτίδια [481-483]. Από την άλλη, παρά την αντίστροφη σχέση της HDL χοληστερόλης με τον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν ότι η αύξησή της προσφέρει καρδιαγγειακό όφελος [476].

Ο υπολογισμός των λιπιδίων (Εικόνα 16) στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη γίνεται σε δείγματα πλάσματος, συνήθως μετά από νηστεία με τη βοήθεια αυτοματοποιημένων αναλυτών με ικανοποιητική ακρίβεια [284]. Ωστόσο κατά το παρελθόν ή για ερευνητικούς σκοπούς έχει εφαρμοσθεί η φυγοκέντρηση των λιποπρωτεϊνών για τον διαχωρισμό τους, που είναι αρκετά χονοβόρα διαδικασία και ακριβή [484, 485]. Η μέτρηση των λιποπρωτεϊνών μπορεί να γίνει με άμεσο τρόπο, ωστόσο συνηθέστερα χρησιμοποιείται η φόρμουλα του Friedewald όπου όταν τα τριγλυκερίδια < 400 mg/dl και με προϋπόθεση ότι ο λόγος χοληστερόλης/τριγλυκερίδια στις VLDL είναι σταθερός, η LDL χοληστερόλη υπολογίζεται ως εξής: LDL χοληστερόλη = ολική χοληστερόλη - HDL χοληστερόλη - Τριγλυκερίδια/5 [476]. Ωστόσο, και οι άμεσες μέθοδοι προσδιορισμού της LDL χοληστερόλης έχουν περιορισμούς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ειδικά επί υπερτριγλυκεριδαιμίας [476]. Ειδικά για τους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, υπερτριγλυκεριδαιμία και μεταβολικό σύνδρομο η LDL θα πρέπει να αξιολογείται με προσοχή [476]. Όσον αφορά την apoB, η μέτρησή της αντανάκλα το συνολικό αριθμό των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών (ειδικά της LDL) που κυκλοφορούν, και γίνεται με τη χρήση αυτοματοποιημένων αναλυτών χωρίς να απαιτείται νηστεία [480]. Επίσης, για εξειδικευμένους και ερευνητικούς σκοπούς η μέτρηση του μεγέθους των LDL μορίων (μικρές, πυκνές LDL) μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση σε gel, υπερφυγοκέντρηση, μελέτη κινητικότητας ιόντων, φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού [486-488]. Τέλος, η Lp(a) μετράται με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων [489].

Εικόνα 15: Περιγραφή των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των λιποπρωτεϊνών του ορού [476].

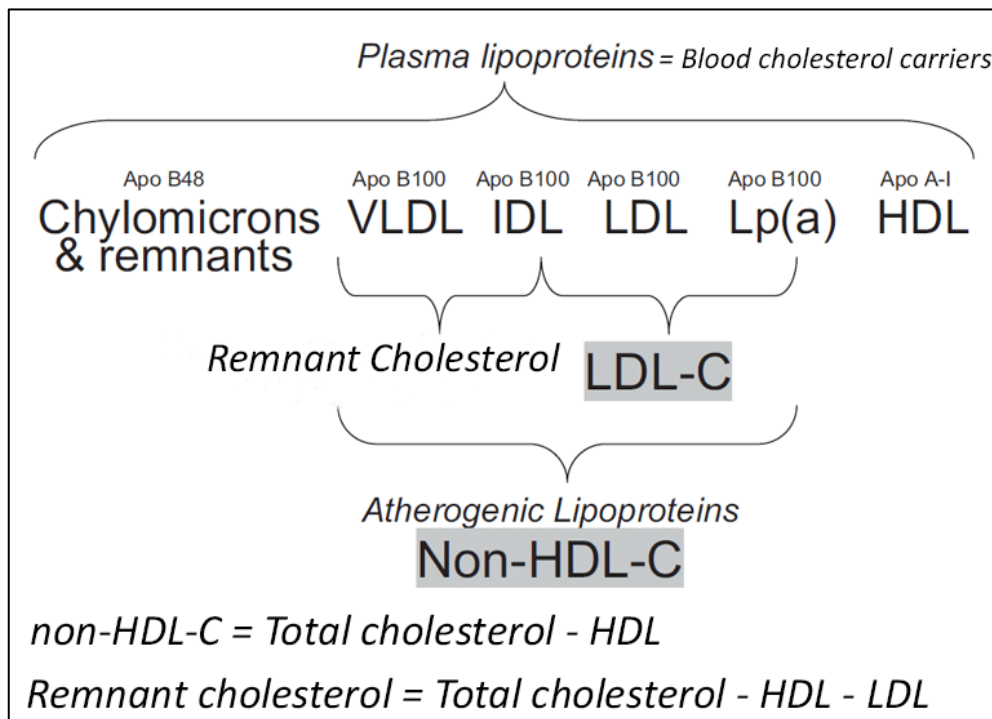
Table 6 Physical and chemical characteristics of human plasma lipoproteins

	Density (g/mL)	Diameter (nm)	TGs (%)	Cholesteryl esters (%)	PLs (%)	Cholesterol (%)	Apolipoproteins	
							Major	Others
Chylomicrons	<0.95	80–100	90–95	2–4	2–6	1	ApoB-48	ApoA-I, A-II, A-IV, A-V
VLDL	0.95–1.006	30–80	50–65	8–14	12–16	4–7	ApoB-100	ApoA-I, C-II, C-III, E, A-V
IDL	1.006–1.019	25–30	25–40	20–35	16–24	7–11	ApoB-100	ApoC-II, C-III, E
LDL	1.019–1.063	20–25	4–6	34–35	22–26	6–15	ApoB-100	
HDL	1.063–1.210	8–13	7	10–20	55	5	ApoA-I	ApoA-II, C-III, E, M
Lp(a)	1.006–1.125	25–30	4–8	35–46	17–24	6–9	Apo(a)	ApoB-100

Apo = apolipoprotein; HDL = high-density lipoprotein; IDL = intermediate-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein; Lp(a) = lipoprotein(a); PLs = phospholipids; TGs = triglycerides; VLDL = very low-density lipoprotein.

© ESC 2019

Εικόνα 16: Κατηγοριοποίηση των λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών του ορού [490].



Lp-PLA2

Η λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A2 (Lp-PLA2) είναι ένα ένζυμο της υπεροξειδογένειας PLA2 το οποίο εκκρίνεται από τα μακροφάγα και κυκλοφορεί στο αίμα ως συστατικό της LDL (σε ποσοστό 70-80%) και της HDL χοληστερόλης (σε ποσοστό 20-30%), ενώ σπάνια συνδέεται με την VLDL και την Lp(a) [491, 492]. Η Lp-PLA2 είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη 45 kDa που λειτουργεί απουσία ασβεστίου και δρα ως φωσφολιπάση (στη θέση *sn*-2 των φωσφολιπιδίων) αλλά και ως ουδέτερη λιπάση [493]. Μάλιστα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η Lp-PLA2 μπορεί να μετακινείται ανάμεσα στα μόρια της LDL και της HDL χοληστερόλης, γεγονός που πιθανώς αντανάκλα τους διαφορετικούς ρόλους της σχετικά με την παθοφυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος και συγκεκριμένα τις αντιαθηρογόνες δράσεις κατά τη σύνδεσή της με την HDL και τις προαθηρογόνες κατά τη σύνδεσή της με την LDL [494]. Χαρακτηριστικά, η Lp-PLA2 εμπλέκεται στη διαδικασία της φλεγμονής λόγω της υδρόλυσης των οξειδωμένων μορίων LDL και της επακόλουθης παραγωγής της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης και των οξειδωμένων μη-εστεροποιημένων λιπαρών οξέων, που έχουν προαθηρογόνο δράση [495]. Μάλιστα, η αυξημένη έκφραση της Lp-PLA2 στις αθηρωματικές πλάκες σχετίζεται με τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, υποδηλώνει την παρουσία φλεγμονής και έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία ως δείκτης για μελλοντικά καρδιαγγειακά επεισόδια [495]. Για το λόγο αυτό, έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες ώστε να ανασταλεί η δράση της Lp-PLA2 με τη δημιουργία ειδικών αναστολέων της και παρά την αποτυχία ορισμένων κλινικών μελετών βρίσκονται σε εξέλιξη προκλινικές και κλινικές μελέτες που αξιολογούν πιθανά μόρια-αναστολείς ως πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες [496, 497]. Οι αντιαθηρογόνες δράσεις

της Lp-PLA2 στηρίζονται στην αναστολή της διάσπασης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και στην απομάκρυνση των φωσφολιπιδίων από τα τροποποιημένα μόρια LDL [495]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχει μεγάλη ετερογένεια σχετικά με την κατανομή της Lp-PLA2 ανάμεσα σε ασθενείς με υπερλιπιδιμία, στεφανιαία νόσο, παροξυσμική κοιλιακή μαρμαρυγή και χρόνια νεφρική νόσο [498]. Αυξημένες τιμές της Lp-PLA2 σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο έχουν παρουσιάσει αυξημένη καρδιαγγειακή θνητότητα, ομοίως σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, αλλά και με την πρόοδο της στένωσης της αορτικής βαλβίδας [499-501]. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την Lp-PLA2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p12-21.1 και υπάρχουν πολυμορφισμοί του που μπορεί να δικαιολογούν τον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, ωστόσο χωρίς κάποια συσχέτιση να έχει επιβεβαιωθεί με ακρίβεια [502].

Όσον αφορά τον εργαστηριακό προσδιορισμό της Lp-PLA2, ο Food and Drug Administration (FDA) το 2014 έδωσε έγκριση για τη μέτρησή της σε ασθενείς χωρίς στεφανιαία νόσο για την εκτίμηση του κινδύνου για μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα [503]. Ομοίως, η ESC έχει συστήσει τη μέτρησή της σε άτομα με αυξημένο κίνδυνο για υποτροπιάζοντα οξεία αθηροθρομβωτικά επεισόδια [504, 505]. Διάφορες αναλυτικές μέθοδοι υπάρχουν για την εκτίμηση της Lp-PLA2 που αφορούν τόσο την αξιολόγηση της συγκέντρωσής της, αλλά και τη μέτρηση της ενζυμικής της ικανότητας και γίνονται μετά από αιμοληψία περιφερικού φλεβικού αίματος, όπως οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι (ELISA) και το PLAC test, ενώ τιμές άνω των 225 nmol/min/mL αναδεικνύουν τα άτομα σε αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο [506, 507].

D-dimer

Τα D-dimer είναι ένας βιοδείκτης που αντανακλά την αποδόμηση των μορίων του ινώδους και απελευθερώνονται μετά από την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης. Συγκεκριμένα, κατά την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης το ινωδογόνο αποδομείται σε μονομερή ινικής με τη δράση της θρομβίνης, τα μονομερή διαμορφώνουν πολυμερή ινικής και αποτελούν το υπόστρωμα για την ενεργοποίηση του παράγοντα XIII και της πλασμίνης, που τελικά αποδομεί τα μόρια του ινώδους [508]. Τα αντιγόνα D-dimer προκύπτουν είτε μετά την αποδόμηση της ινικής από την πλασμίνη, είτε υπάρχουν στα προϊόντα αποδόμησης του ινώδους σε διαλυτή μορφή πριν δημιουργηθεί το ινώδες [508]. Τα D-dimer μεταβάλλονται σε σχέση με την ηλικία και αυξάνονται σε πληθώρα κλινικών καταστάσεων όπως η πνευμονική εμβολή, οι αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις (καταστάσεις υπερπηκτικότητας), σε λοιμώξεις σε βαρέως πάσχοντες, στις ηπατοπάθειες, στη διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, στα κακοήγη νοσήματα, στην καρδιακή ανεπάρκεια, την κοιλιακή μαρμαρυγή, στη νεφρική ανεπάρκεια, τα τραύματα, την εγκυμοσύνη και την περιφερική αγγειακή νόσο [508, 509].

Η συνηθέστερη χρήση τους κλινικά στηρίζεται στο ότι οι χαμηλές τιμές τους απομακρύνουν από τη διάγνωση της πνευμονικής εμβολής και της εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης σε ασθενείς με χαμηλή κλινική υποψία για θρόμβωση, ενώ ένα θετικό τεστ είναι ενδεικτικό θρόμβωσης αλλά όχι αποδεικτικό της θρόμβωσης [510-512]. Παρόλα αυτά, η διάγνωση της πνευμονικής εμβολής στηρίζεται στην κλινική εικόνα των ασθενών και στην πιθανότητα για πνευμονική εμβολή που σχετίζεται με το ιστορικό των ασθενών (κριτήρια Well), ενώ πέραν των D-dimer χρησιμοποιούνται απεικονιστικές εξετάσεις (αξονική τομογραφία με πρωτόκολλο πνευμονικής αγγειογραφίας που αποτελεί και τη μέθοδο εκλογής για τη διάγνωση της πνευμονικής εμβολής, σπινθηρογράφημα αερισμού-

αιμάτωσης πνευμόνων, υπερηχογράφημα συμπίεσης φλεβών κάτω άκρων) που είναι χρήσιμες ειδικά σε καταστάσεις αμφιβολίας [513-515]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυξημένες τιμές D-dimer έχουν προγνωστική ικανότητα σε νοσηλεύομενους ασθενείς με οξεία νόσο για εμφάνιση εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης, σχετίζονται με δυσμενή επιβίωση σε ασθενείς με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, σχετίζονται με τη θνησιμότητα σε ασθενείς με διαχωρισμό της αορτής [516-522]. Παράλληλα, τα επίπεδά τους έχουν μελετηθεί ως πιθανοί δείκτες για τη διάρκεια χορήγησης αντιπηκτικής αγωγής σε ασθενείς με εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση αλλά και για τη διάγνωση και παρακολούθηση των ασθενών με διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και σχετίζονται με το μέγεθος του θρόμβου στην πνευμονική εμβολή και με τους δείκτες επιβάρυνσης της δεξιάς κοιλίας [523, 524]. Τέλος, σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα, έχουν προγνωστική ικανότητα για δυσμενή επιβίωση και για καρδιαγγειακά συμβάματα εντός της νοσηλείας σε ασθενείς μετά από οξεία στεφανιαία σύνδρομο, σε ασθενείς που νοσηλεύονται με οξεία καρδιακή ανεπάρκεια και σε ασθενείς με σήψη [525-527].

Εργαστηριακά, τα D-dimer μετρώνται στο ολικό αίμα, στο πλάσμα ή τον ορό με μεθόδους που ανιχνεύουν έναν αντιγονικό επίτοπο με τη βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων όπως η ELISA, ο ανοσοφθορισμός και η ανοσοσυγκόλληση latex [509, 528]. Υπάρχουν μέθοδοι με υψηλή ευαισθησία ($\geq 95\%$) αλλά χαμηλή ειδικότητα (40%) όπου ένα αρνητικό τεστ αποκλείει τη διάγνωση της πνευμονικής εμβολής ή της εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης, και μέθοδοι με μέτρια ευαισθησία (80-94%) αλλά μεγαλύτερη ειδικότητα (~70%), οι οποίες θα πρέπει να συνδυάζονται με κάποιο άλλο διαγνωστικό τεστ [514, 529]. Μια άλλη στρατηγική περιλαμβάνει την παρουσία ειδικών διαγνωστικών κατωφλίων ανάλογα με την ηλικία με σκοπό την αύξηση της ειδικότητας χωρίς να μεταβληθεί η ευαισθησία όπως για παράδειγμα σε ασθενείς άνω των 50 ετών που δεν έχουν υψηλή πιθανότητα για εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (συγκεκριμένα έχει περιγραφεί για ασθενείς κάτω των 50 ετών ως κατώφλι D-dimer $<500 \mu\text{g/L}$ για τον αποκλεισμό της εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης, ενώ για τους άνω των 50 ετών έχει προταθεί ως διαγνωστικό κατώφλι το δεκαπλάσιο της ηλικίας (πχ. για τους ασθενείς 75 ετών προτείνεται το διαγνωστικό όριο των $<750 \mu\text{g/L}$) [529].

Ομοκυστεΐνη

Η ομοκυστεΐνη είναι ένα αμινοξύ που περιέχει θείο και παράγεται κατά το μεταβολισμό της μεθειονίνης με σημαντικό ενδιάμεσο μόριο την S-adenosylmethionine που σχετίζεται με τη μεθυλίωση του DNA και το σχηματισμό των κατεχολαμινών [530]. Η ομοκυστεΐνη κυκλοφορεί στο μεγαλύτερο ποσοστό της συνδεδεμένη με τις πρωτεΐνες του πλάσματος με δισουλφιδικούς δεσμούς και κυρίως με την αλβουμίνη (70-80%) και σε ποσοστό 20-30% ως διμερή ομοκυστεΐνης ή συνδεδεμένη με θειόλες [531]. Ωστόσο, ανεπάρκειες βιταμινών (φυλλικό οξύ, B6 και B12) αλλά και ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης (με συνηθέστερη την παρουσία του πολυμορφισμού της αναγωγάσης του μεθυλενοτετραυδροφυλλικού, *MTFHR* 677C>T) σχετίζονται με αύξηση των τιμών της (υπερομοκυστεϊναιμία) διάφορων βαθμών (ήπια, μετρίου βαθμού και σοβαρού βαθμού) με διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις, παρότι πιο συχνά τα επίπεδά της είναι μέτρια και ήπια αυξημένα στο γενικό πληθυσμό [530, 532, 533]. Οι αυξημένες τιμές ομοκυστεΐνης έχουν συσχετισθεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο και με την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης λόγω της παραγωγής ROS και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, που βλάπτουν την ακεραιότητα του ενδοθηλίου και σχετίζονται με την ενδοθηλιακή

δυσλειτουργία, τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO και την επακόλουθη αθηροθρόμβωση ενώ παράλληλα εμπλέκονται σε μεταβολές της επιγενετικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (πχ. τροποποίηση της μεθυλίωσης του DNA, των non-coding RNA) και της μεταμεταφραστικής τροποποίησης των πρωτεϊνών [534-536]. Ποικίλες μελέτες έχουν διερευνήσει τις επιπτώσεις της υπερομοκυστεϊναιμίας για το καρδιαγγειακό σύστημα με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, ωστόσο, η υπερομοκυστεϊναιμία αποτελεί έναν ελάσσονα παράγοντα κινδύνου για το καρδιαγγειακό σύστημα και θα πρέπει να θεραπεύεται ειδικά για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου [530]. Η υπερομοκυστεϊναιμία επιδεινώνει τις επιβλαβείς δράσεις των παραγόντων κινδύνου (αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, κάπνισμα, δυσλιπιδαιμία) [533]. Διάφορες θεραπευτικές προσπάθειες έχουν αξιολογηθεί με σκοπό την αντιμετώπιση της υπερομοκυστεϊναιμίας όπως με τη χορήγηση φυλλικού οξέος και βιταμινών B6 και B12 που μειώνουν τις αυξημένες τιμές της, χωρίς ωστόσο να έχει τεκμηριωθεί η αποτελεσματικότητά τους για τη μείωση του κινδύνου για καρδιαγγειακά επεισόδια [537]. Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, πιθανώς είναι απαραίτητη η θεραπεία της υπερομοκυστεϊναιμίας σε τιμές της άνω των 11 $\mu\text{mol/L}$, ειδικά για τη μείωση των τοξικών επιδράσεων της αυξημένης ομοκυστεΐνης για το νευρικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένου του κινδύνου για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και για αγγειακή άνοια [538, 539]. Τέλος, τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης μετρώνται στο πλάσμα με τη βοήθεια ανοσολογικών μεθόδων [533].

Λόγος αλβουμίνης-κρεατινίνης ούρων (Albumin to creatinine ratio, ACR)

Ο λόγος αλβουμίνης προς κρεατινίνη ούρων (ACR) είναι ένας δείκτης που υπολογίζεται σε τυχαίο δείγμα ούρων (συνηθέστερα σε πρωινό δείγμα ούρων) μετρώντας την ποσότητα της μικροαλβουμίνης ούρων δια την κρεατινίνη ούρων [540]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, εκφράζει το βαθμό της αποβολής λευκώματος (πρωτεΐνης) από τους νεφρούς και αντανακλά την παρουσία μικρολευκωματουρίας (30-300 mg/g) ή λευκωματουρίας (>300mg/g), που έχει προγνωστική αξία για καρδιαγγειακά συμβάματα, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι σακχαρώδους διαβήτη [541]. Ο λόγος ACR έχει συσχετισθεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο όχι μόνο για τους ασθενείς με καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου (πχ. σακχαρώδης διαβήτης, αρτηριακή υπέρταση, στεφανιαία νόσος, αυξημένη ηλικία) αλλά και για το γενικό πληθυσμό [540, 542]. Επιπλέον, εκφράζει το ρυθμό προόδου της νεφρικής βλάβης και της εξέλιξης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας [543].

Βιοδείκτες καρδιαγγειακού συστήματος με κυρίως ερευνητικό ενδιαφέρον

Στο σημείο αυτό θα γίνει μια σύντομη αναφορά των βασικότερων κυκλοφορούντων βιοδεικτών που εξετάζονται σε ερευνητικό επίπεδο και δεν χρησιμοποιούνται ακόμη στην καθημερινή κλινική πρακτική, δίνοντας πληροφορίες για τα βασικά τους χαρακτηριστικά, τη μεθοδολογία προσδιορισμού τους και τη συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος. Για τους περισσότερους από αυτούς υπάρχει ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με το ρόλο τους στη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία των περισσότερων καρδιαγγειακών νοσημάτων, ωστόσο, πολλοί από αυτούς δεν είναι ειδικοί για τα καρδιαγγειακά νοσήματα αλλά εκφράζονται και σε άλλες καταστάσεις και συνηθέστερα σε φλεγμονώδεις καταστάσεις και τα κακοήθη νοσήματα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Βιοδείκτες καρδιαγγειακού συστήματος που βρίσκονται σε ερευνητικό επίπεδο
<i>Μυελοπεροξειδάση (MPO) [544-556]</i>
<ul style="list-style-type: none">• Κατιονική πρωτεΐνη, διμερής (πανομοιότυπα διμερή, λειτουργικά ανεξάρτητα), 146 kDa, πρωτεΐνη του ενδογενούς ανοσολογικού συστήματος, παραγωγή από πολυμορφοπύρρηνα ως απάντηση σε μικροβιακούς παράγοντες, πρόκληση κυτταρικής, οξειδωτικής βλάβης και φλεγμονής• Καταλύει την μετατροπή του H₂O₂ με τα ανιόντα χλωρίου προς σχηματισμό υποχλωριώδους οξέος και άλλων οξειδωτικών μορίων• Συμμετοχή στους μηχανισμούς της αθηρωμάτωσης, στην οξειδωτική τροποποίηση λιποπρωτεϊνών, συσχέτιση με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, την ασταθή αθηρωματική πλάκα, πρόγνωση για τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, συμμετοχή στην παθοφυσιολογία των αορτικών ανευρυσμάτων, συσχέτιση με τον κίνδυνο για κοιλιακή μαρμαρυγή, δοσοεξαρτώμενη σχέση ανάμεσα στις τιμές MPO και τη σοβαρότητα της στεφανιαίας νόσου, προγνωστική ικανότητα σε ασθενείς με περιφερική αγγειοπάθεια• Συμμετοχή και σε άλλες παθοφυσιολογικές διαδικασίες: νευροεκφυλιστικές νόσοι, καρκίνος, νεφρική νόσος, χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, αναπνευστικά νοσήματα• Προσπάθεια στόχευσής της με ειδικούς αναστρέψιμους και μη-αναστρέψιμους παράγοντες στα πλαίσια της θεραπείας των χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων• Μέτρηση με ανοσοενζυμικές μεθόδους (πχ. ELISA) ή με αυτοματοποιημένα συστήματα χημειοφωταύγειας από δείγμα περιφερικού φλεβικού αίματος
<i>Ιντερλευκίνη-6 (IL-6) [557-566]</i>
<ul style="list-style-type: none">• Πρωτεΐνη 212 αμινοξέων (~20 kDa), χρωμόσωμα 7p21, συστατικό του ενδογενούς ανοσολογικού μηχανισμού, παράγεται στα πλαίσια της φλεγμονής από τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, πρόδρομο μόριο κατά την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών πρωτεϊνών (CRP, ινωδογόνο κλπ)• Δύο μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης: Κλασική σηματοδότηση (σύνδεση IL-6 με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα IL-6 στα ηπατοκύτταρα, λευκοκύτταρα, T-κύτταρα → αντίδραση οξείας φάσης και παραγωγή CRP με κυρίως προστατευτικές

<p>δράσεις), trans-signalling (σύνδεση IL-6 με το διαλυτό υποδοχέα και άσκηση επιβλαβών, προφλεγμονωδών δράσεων)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Προαθηρογόνος δράση, συσχέτιση με τη φλεγμονή στα πλαίσια παραγόντων κινδύνου (πχ. δυσλιπιδαιμία, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, παχυσαρκία), συμμετοχή στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης, συσχέτιση με την αθηροθρόμβωση, συσχέτιση με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομο, ανευρύσματα, καρδιακή ανεπάρκεια, χρόνια νεφρική νόσο • Συμμετοχή στην παθοφυσιολογία των αυτοάνοσων, χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων και των λοιμώξεων • Σε εξέλιξη κλινικές μελέτες για την ειδική της αναστολή με ειδικές θεραπείες (πχ. ziltivekimab) για τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με αθηροσκληρωτική καρδιοπάθεια, υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου (πχ. ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο και αυξημένα CRP) • Μέτρηση σε δείγματα περιφερικού φλεβικού αίματος με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων (πχ. ELISA)
<p>Μόρια διακυτταρικής προσκόλλησης (ICAM-1, VCAM-1, P-selectin) [567-576]</p> <ul style="list-style-type: none"> • Μόρια που εκφράζονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα και μεσολαβούν στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κυκλοφορούντα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος στα πλαίσια της φλεγμονής (πχ. επαγωγή της σύνθεσής τους από τον TFN-α και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες), συσχέτιση με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, την έναρξη και πρόοδο της αθηρωμάτωσης και τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα, κολπική μαρμαρυγή, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, παχυσαρκία • ICAM-1 (Μέλος της υπερικογενείας των ανοσοσφαιρινών, μοριακό βάρος 90kDa): Διαμεμβρανικό μόριο προσκόλλησης που εκφράζεται στα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, συμμετέχει στην προσέλκυση και πρόσδεση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα • VCAM-1 (Μέλος της υπερικογενείας των ανοσοσφαιρινών, μοριακό βάρος 90kDa): Διαμεμβρανικό μόριο προσκόλλησης που εκφράζεται στις λείες μυικές ίνες των αγγείων, συμμετέχει στην προσέλκυση μακροφάγων και T κυττάρων και στη διαπίδυσή τους δια του αγγειακού τοιχώματος • P-selectin: Διαμεμβρανική πρωτεΐνη που υπάρχει στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και τα σωματίδια Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων, συμμετέχει στην προσέλκυση των λευκοκυττάρων επί των ενδοθηλιακών κυττάρων και στην περαιτέρω παραγωγή κυτταροκινών που οδηγούν στην έκφραση των μορίων προσκόλλησης επί των ενδοθηλιακών κυττάρων και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων επί των λευκοκυττάρων, συμμετοχή στους μηχανισμούς της θρόμβωσης (πχ. οξεία στεφανιαία σύνδρομο, περιφερική αγγειοπάθεια, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο) • Έκφραση σε μια σειρά χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων, κακοήγη νοσήματα, λοιμώξεις • Μέτρηση σε δείγμα περιφερικού φλεβικού αίματος, συνηθέστερα με ανοσοενζυμικές μεθόδους (πχ. ELISA) • Πιθανό όφελος από την αναστολή τους με ειδικά μόρια, πιθανοί στόχοι χορήγησης ειδικών θεραπειών προς το ενδοθήλιο (πχ. νανοσωματίδια, λιποσώματα)

Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP-1) [577-582]

- Κυτταροκίνη (ή αλλιώς CCL2) μοριακού βάρους 13 kDa, παράγεται από το χρωμόσωμα 17 από μια σειρά κυττάρων (πχ. ενδοθηλιακά, λείες μυικές ίνες, μονοκύτταρα) στα πλαίσια του οξειδωτικού στρες και της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών
- Συμμετοχή στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρυνσης ως χημειοτακτικός παράγοντας των μονοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα, συσχέτιση με την επαναστένωση των στεφανιαίων αγγείων, την αρτηριακή υπέρταση, την καρδιακή ανεπάρκεια (αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου) και την καρδιαγγειακή θνητότητα σε υγιείς και στεφανιαίους ασθενείς
- Συμμετοχή σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, κακοήγη νοσήματα, λοιμώξεις
- Προσπάθειες στόχευσής της με μονοκλωνικά αντισώματα, γονιδιακή θεραπεία, εξέταση του άξονα CCL2-υποδοχέα CCL2 σε κλινικές μελέτες
- Μέτρηση σε δείγμα περιφερικού αίματος με ανοσοενζυμικές τεχνικές, συνηθέστερα με ELISA

Παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (TNF- α) [583-588]

- Κυτταροκίνη (17 kDa), παράγεται από τα μακροφάγα και τα μυοκαρδιακά κύτταρα, υπάρχει σε διαλυτή και διαμεμβρανική μορφή, σύνδεση σε δύο διαφορετικούς υποδοχείς → υποδοχέας 1: προφλεγμονώδεις δράσεις vs. υποδοχέας 2: προστατευτική δράση
- Συμμετοχή στη φλεγμονή, στην πρόοδο της αθηρωμάτωσης και στη ρήξη της ευάλωτης αθηρωματικής πλάκας, στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες, συσχέτιση με την παθοφυσιολογία της καρδιακής ανεπάρκειας, με τη βλάβη λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, τη μυοκαρδίτιδα, την απόρριψη του μοσχεύματος, την καχεξία, την αθηροθρόμβωση, με αυξημένα επίπεδα μετά από εμφραγμα, αυξημένα επίπεδα στην αρτηριακή υπέρταση
- Θεραπευτικές προσπάθειες για αναστολή δράσης TNF α (μονοκλωνικά αντισώματα) με καρδιαγγειακά οφέλη
- Μέτρηση σε δείγμα περιφερικού φλεβικού αίματος με ανοσοενζυμικές τεχνικές (πχ. ELISA, RIA)

Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) [589-597]

- Οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων (ενδοπεπτιδάσες που αποτελούνται από ψευδάργυρο, περισσότερα από 20 γνωστά ένζυμα, διαμεμβρανικά μόρια ή κυκλοφορούντα στο αίμα), ενεργοποίηση από ανενεργά ζυμογόνα μόρια, συμμετοχή στους μηχανισμούς της εμβρυογένεσης/αγγειογένεσης και επούλωσης, παραγωγή σε καταστάσεις φλεγμονής, συσχέτιση με την αγγειακή αναδιαμόρφωση και τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας (αποδόμηση ινώδους κάψας/εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, ειδικά οι MMP-2 και MMP-9), συσχέτιση με αναδιαμόρφωση μυοκαρδίου μετά από έμφραγμα, συσχέτιση με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη/μεταβολικό σύνδρομο, συσχέτιση με αγγειακές βλάβες στα πλαίσια της υπέρτασης, συσχέτιση με την παθοφυσιολογία των αορτικών ανευρυσμάτων, την πνευμονική υπέρταση και νόσων όπως ο καρκίνος και τα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα

- Πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι υπό μελέτη για την αντιμετώπιση της αναδιαμόρφωσης στην καρδιακή ανεπάρκεια, της ευάλωτης αθηρωματικής πλάκας στην αθηρωμάτωση και της αγγειακής αναδιαμόρφωσης στην αρτηριακή υπέρταση
- Μέτρηση στο αίμα με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων (πχ. ELISA, Western blot)

Ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs) [596, 598, 599]

- Φυσικοί ιστικοί αναστολείς των δράσεων των MMPs, προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο των MMPs με διαφορετικού βαθμού συγγένεια, οικογένεια 4 πρωτεϊνών στον άνθρωπο (~21 kDa)
- Ο λόγος MMP/TIMP καθορίζει το βαθμό αποδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της προόδου νοσημάτων όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος και τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα
- Προσπάθεια για αναστολή δράσης MMPs και επαναφορά της ισορροπίας MMPs/TIMPs σε ερευνητικό επίπεδο ως πιθανού στόχου για τις νόσους που εμπλέκεται η δράση των MMPs
- Μέτρηση στο αίμα με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων

Παράγοντας von Willebrand (vWF) [600-608]

- Πολυμερής γλυκοπρωτεΐνη (αποτελείται από πολυμερή διάφορων μεγεθών), παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποθηκεύεται στα σωμάτια Weibel-Palade, παράγεται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίησή τους, κυκλοφορεί στο αίμα και συμμετέχει στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων (σύνδεση με τον υποενδοθηλιακό χώρο) στις θέσεις αγγειακής βλάβης ή σε αρτηριακές στενώσεις, συνδέεται με τον παράγοντα πήξης VIII και τον προστατεύει από αποδόμηση, συμμετέχει στους μηχανισμούς της φλεγμονής και της επακόλουθης θρόμβωσης (απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα) και στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία
- Έχει ως ανταγωνιστή την πρωτεΐνη ADAMTS-13, η έλλειψη του vWF σχετίζεται με κίνδυνο για αιμορραγία
- Αύξηση των τιμών του έχει προγνωστική αξία για την πρόβλεψη του καρδιαγγειακού κινδύνου στη στεφανιαία νόσο, σχετίζεται με την πρόκληση εμφράγματος του μυοκαρδίου, σχετίζεται με το βαθμό σοβαρότητας των βαλβιδοπαθειών και με την επιτυχία της αντιμετώπισής τους, πιθανή η συμμετοχή πολυμορφισμών του vWF στο διαφορετικό κίνδυνο για καρδιαγγειακή νοσο
- Αυξάνεται επιπλέον σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα
- Πιθανός θεραπευτικός στόχος για τη μείωση του θρομβωτικού κινδύνου με κλασικές θεραπείες και με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα αλλά και ερευνητικές εφαρμογές με χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης ADAMTS-13
- Μέτρηση της ποσότητας του αντιγόνου του vWF μετά από αιμοληψία περιφερικού φλεβικού αίματος με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων (πχ. ELISA), ηλεκτροφόρηση σε gel για την ανάδειξη των πολυμερών του και ειδικά τεστ ελέγχου αιμοπεταλιακής δραστηριότητας (πχ. platelet function assay 100, PFA-100)

Transforming growth factor β (TGF- β) [609-614]

- Αυξητικός παράγοντας (για το καρδιαγγειακό σύστημα σημαντικότερες δράσεις έχει ο TGF-β1), προσδένεται σε κυτταρικούς υποδοχείς και μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων (μέσω των πρωτεϊνών Smads), προσδένεται στους υποδοχείς 1 και 2, ρύθμιση των μηχανισμών της φλεγμονής και της ίνωσης
- Συμμετέχει σε πλειάδα δράσεων όπως στην εμβρυογένεση του καρδιαγγειακού συστήματος, στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και στρες, κυτταρικής διαφοροποίησης, ρύθμισης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, στους ανοσολογικούς μηχανισμούς, ασκεί αγγειογενετικές (αλλά και αντι-αγγειογενετικές δράσεις), συμμετέχει στην ογκογένεση
- Υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που υποστηρίζουν προστατευτικές επιδράσεις στο μυοκάρδιο (πχ. σταθεροποίηση αθηρωματικής πλάκας)
- Συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου και της ίνωσης μετά από έμφραγμα (εκδήλωση της καρδιακής ανεπάρκειας), στην αναδιαμόρφωση του αγγειακού τοιχώματος, στην επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική και στην ίνωση στα πλαίσια των παραγόντων κινδύνου (σακχαρώδης διαβήτης, υπέρταση)
- Μεταλλάξεις στο μονοπάτι κυτταρικής σηματοδότησης του TGF-β (πχ. στον υποδοχέα του TGF-β) σχετίζονται με την παθοφυσιολογία των αορτικών ανευρυσμάτων (πχ. σύνδρομο Marfan), τις βαλβιδοπάθειες και τις μυοκαρδιοπάθειες
- Θεραπευτικό όφελος από τη στόχευση του TGF-β στην επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική και στην ίνωση (πχ. χορήγηση αντι-ινωτικών θεραπειών, ειδικών αντι-ινωτικών παραγόντων)
- Μετράται μετά από αιμοληψία σε δείγμα περιφερικού φλεβικού αίματος με τη βοήθεια ανοσοεξυμικών μεθόδων (πχ. ELISA)

Growth differentiation factor-15 (GDF-15) [56, 615-624]

- Μέλος της οικογένειας του TGF-β, ομοδιμερής πρωτεΐνη 25 kDa, εκκρίνεται από ποικίλα κύτταρα (πχ. ενδοθηλιακά, μυοκαρδιακά, μακροφάγα, λείες μυϊκές ίνες, ινοβλάστες)
- Υπό φυσιολογικές συνθήκες ασκεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις, συμμετέχει στην ανοσολογική απάντηση σε εισβολείς και αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/eNOS και μείωση της έκφρασης των μορίων του μονοπατιού NF-κB/JNK στα ενδοθηλιακά κύτταρα)
- Ανάπτυξη αντίστασης στους υποδοχείς του σε παθολογικές καταστάσεις με συνέπεια την αύξηση των επιπέδων του GDF-15 (πχ. φλεγμονή, κακοήθη νοσήματα)
- Αυξημένες τιμές του μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου σχετίζονται με την καρδιαγγειακή θνητότητα και τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακής ανεπάρκειας, με την παρουσία και το βαθμό σοβαρότητας της στεφανιαίας νόσου, συσχέτιση με την υπερτροφία της αριστερής κοιλίας σε υπερτασικούς ασθενείς, αυξημένες τιμές στο μεταβολικό σύνδρομο, το σακχαρώδη διαβήτη και τη νεφρική ανεπάρκεια λόγω σακχαρώδους διαβήτη
- Μη-σαφή τα δεδομένα σχετικά με τη συμμετοχή του στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας, ωστόσο οι αυξημένες τιμές του έχουν προγνωστική ικανότητα σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, πιθανή η συμμετοχή του σε προφλεγμονώδεις, προ-αποπτωτικές δράσεις και σχετιζόμενες με την ίνωση

- Μετράται στο αίμα με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών (ELISA) και ανοσοραδιομετρικών μεθόδων (immunoradiometric assay)

Endothelin-1 (ET-1) [625-635]

- Πεπτίδιο 21 αμινοξέων που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τις λείες μυικές ίνες, τα μακροφάγα, και το μυελό του νεφρού σε δύο στάδια (με πρωτεόλυση από την pre-proET-1), προσδένεται στους υποδοχείς ET_A και ET_B, ενεργοποίηση κυτταρικών μονοπατιών σχετιζόμενων και μη σχετιζόμενων με G-πρωτεΐνες, εκφραση υποδοχέων στις λείες μυικές ίνες, τα μυοκαρδιακά κύτταρα και άλλα όργανα (πχ. πνεύμονες, νεφροί)
- Ασκεί ισχυρές αγγειοσυσπαστικές δράσεις σε αρτηρίες και φλέβες, θετική ινότροπο δράση και μιτογόνες δράσεις, συμμετέχει στους μηχανισμούς της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, του οξειδωτικού στρες (αύξηση των επιπέδων της υπό τη δράση των καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου)
- Συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης (λόγω της αγγειοσύσπασης και της ισχυρής μιτογόνου δράσης), της καρδιακής ανεπάρκειας, στην αγγειακή αναδιαμόρφωση (στην αθηρωμάτωση και την επαναστένωση των στεφανιαίων αγγείων), στη νεφρική ανεπάρκεια (πχ. πρωτεϊνουρία, νεφρική ίνωση και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια), την αγγειακή εγκεφαλική νόσο, την αρτηριακή υπέρταση και τον καρκίνο
- Υπάρχουν ειδικοί ανταγωνιστές για τους υποδοχείς της ενδοθηλίνης με κυρίαρχη θεραπευτική δράση στην πνευμονική αρτηριακή υπέρταση
- Μετράται μετά από αιμοληψία σε δείγμα περιφερικού φλεβικού αίματος με ανοσοενζυμικές μεθόδους (πχ. ELISA)

Μονοξείδιο του αζώτου (NO) [636-647]

- Παραγωγή ενζυματικά από την eNOS υπό φυσιολογικές συνθήκες στα ενδοθηλιακά κύτταρα (από την iNOS σε συνθήκες φλεγμονής και την nNOS από τα νευρωνικά κύτταρα) με υπόστρωμα το αμινοξύ L-arginine, το ένζυμο NADPH και συμπαραγόντες, αέριο μόριο (με χρόνο ημίσειας ζωής 3-5 δευτερόλεπτα) που διαχέεται στις λείες μυικές ίνες και μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης και την παραγωγή του cGMP
- ADMA: αναστολέας της eNOS, η αύξησή της σχετίζεται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO υπό τη δράση των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου
- Κυρίαρχο μόριο για την ομοιοστάση της ενδοθηλιακής λειτουργίας (και συγκεκριμένα η παραγωγή του από την eNOS): ρύθμιση αγγειακού τόνου, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιπηκτικές, αντι-υπερπλαστικές, αντιαποπτωτικές δράσεις
- Μειωμένη βιοδιαθεσιμότητά του στα πλαίσια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας λόγω της αποσύζευξης της eNOS και της αύξησης των επιπέδων της ADMA (υπό τη δράση των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου), συσχέτιση με δυσμενή πρόγνωση για τα περισσότερα καρδιαγγειακά νοσήματα (στεφανιαία νόσος, σακχαρώδης διαβήτης, καρδιακή ανεπάρκεια, πνευμονική αρτηριακή υπέρταση)
- Θεραπευτικές προσπάθειες για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του NO (πχ. άσκηση, βιταμίνες, φάρμακα καρδιαγγειακού συστήματος), μελέτη πιθανής αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας του NO από διαιτητικές πηγές

- Δύσκολη η εκτίμησή του λόγω του σύνθετου μεταβολισμού του και των παραπροϊόντων του, εκτιμάται με ποικίλους τρόπους, είτε έμμεσα με τη χρήση τεχνικών που αξιολογούν την ενδοθηλιακή λειτουργία σε περιφερικά αγγεία/στεφανιαία αγγεία/μικροκυκλοφορία (πχ. ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή) ή με την ανίχνευση μεταβολιτών του (nitrate/nitrite, ενζυμική δραστηριότητα NOS, cGMP), είτε με την άμεση μέτρησή του στο αρτηριακό αίμα με τη χρήση βιοανιχνευτών (πχ. ειδικοί καθετήρες κατά τη διενέργεια της στεφανιογραφίας), in vitro με φασματομετρικές/ηλεκτροχημικές μεθόδους, in vivo με ηλεκτροχημικές μεθόδους και ειδικούς καθετήρες

Plasminogen activator inhibitor (PAI) [648-656]

- Γλυκοπρωτεΐνη 45 kDa, φυσικός αναστολέας του tPA (ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου) και της ινωδόλυσης, ανήκει στις σερινοπρωτεάσες, αποθηκεύεται κυρίως στα αιμοπετάλια
- Παράγεται στα πλαίσια της ενδοθηλιακής βλάβης και της φλεγμονής, αυξημένες τιμές του σχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο (πχ. έμφραγμα του μυοκαρδίου, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, φλεβικές θρομβώσεις), συσχέτιση με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την πρόκληση ενδοθηλιακής βλάβης στα πλαίσια των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου (αρτηριακή υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, σακχαρώδης διαβήτης, μεταβολικό σύνδρομο), συσχέτιση με την ίνωση σε διάφορα όργανα (πχ. νεφροί) σε αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας του, αύξησή του σε συστηματικές φλεγμονώδεις καταστάσεις (πχ. λοιμώξεις, εγκαύματα, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας)
- Μεταβολή των επιπέδων του από τη χορήγηση κλασικών θεραπειών για τα καρδιαγγειακά νοσήματα και στοχευμένων μορίων που βρίσκονται υπό μελέτη
- Μέτρησή του με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων στο αίμα (πχ. ELISA)

Tissue factor (TF) [657-660]

- Κυρίαρχο μόριο του εξωγενούς καταρρακτη της πήξης, αλληλεπιδρά με τον ενεργοποιημένο παράγοντα VII και ενεργοποιεί τον παράγοντα IX και X και τον καταρράκτη της πήξης με συνέπεια την εναπόθεση ινικής στις θέσεις αγγειακής βλάβης
- Τα επίπεδά του αυξάνονται υπό την παρουσία παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου (αρτηριακή υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, σακχαρώδης διαβήτης), στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα και σχετίζονται με τις μικροαγγειακές επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη
- Εκφράζεται υπό την επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα, κυκλοφορεί ως διαλυτή μορφή και ως διαμεμβρανικός υποδοχέας και σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης και του καρκίνου
- Προσπάθειες αναστολής της δράσης του με τη βοήθεια φαρμακευτικών μέσων και γενετικών τροποποιήσεών του
- Μετράται με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων (πχ. ELISA)

Ινωδογόνο [661-666]

<ul style="list-style-type: none"> • Παράγοντας πήξης (παράγοντας Ι), γλυκοπρωτεΐνη 340 kDa που κυκλοφορεί στο πλάσμα, παράγεται στο ήπαρ (βασική έκκριση), συμμετέχει στο μηχανισμό της πήξης (μετατρέπεται σε ινική μέσω της πρωτεολυτικής διάσπασης από τη θρομβίνη) • Πρωτεΐνη οξείας φάσης: αυξάνεται σε καταστάσεις οξείας φλεγμονής στα πλαίσια της κυκλοφορίας των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (πχ. IL-6) όπως σε λοιμώξεις, στα κακοήγη νοσήματα, στην εγκυμοσύνη, χορήγηση γλυκοκορτικοειδών, συμμετέχει στην επούλωση των πληγών • Οι διαταραχές στη λειτουργία του συνδέονται με τον κίνδυνο για αιμορραγία ή θρομβώσεις • Αυξημένες τιμές ινωδογόνου: αυξημένος καρδιαγγειακός κίνδυνος, συσχέτιση με τα μονοπάτια της φλεγμονής, του οξειδωτικού στρες και της υπερπηκτικότητας, αύξηση της αθηρωματικής πλάκας, συσχέτιση με την αθηροθρόμβωση (στεφανιαία νόσος, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, περιφερική αγγειακή νόσος) • Μέτρηση στο περιφερικό φλεβικό αίμα σε φυαλίδιο με αντιπηκτικό με τη βοήθεια ανοσολογικών μεθόδων (πχ. ανοσονεφελομετρία, ELISA) και με τη λειτουργική δοκιμασία Clauss
<p><i>Προϊόντα μεταβολισμού του κολλαγόνου (Carboxy-terminal propeptide of procollagen type I, PICP και Amino-terminal propeptide of procollagen type III, PIIINP) [667-679]</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> • Κυκλοφορούντες βιοδείκτες που αντανakλούν την παραγωγή του κολλαγόνου και συνεπώς την παρουσία ίνωσης στο μυοκάρδιο με μη-επεμβατικό τρόπο (συσχέτιση της ίνωσης του μυοκαρδίου με τη γένεση αρρυθμιών και την ισχαιμία), συσχέτιση με τη διαστολική δυσλειτουργία του μυοκαρδίου στην καρδιακή ανεπάρκεια • PICP: Αντανakλά τη μετατροπή του προκολλαγόνου τύπου Ι σε κολλαγόνο τύπου Ι (κολλαγόνο τύπου Ι: παρουσιάζει υψηλή διασύνδεση των μορίων του και σχετίζεται με την μυοκαρδιακή σκληρία), συσχέτιση με το συνολικό όγκο κολλαγόνου στο μυοκάρδιο (πχ. ασθενείς με διατατική μυοκαρδιοπάθεια, καρδιακή ανεπάρκεια και υπέρταση), προγνωστική ικανότητα από τις αυξημένες τιμές του σε συνεκτίμηση με δεδομένα από τη χρήση μαγνητικής τομογραφίας (παρουσία φορτίου ίνωσης) σε ασθενείς με διατατική μυοκαρδιοπάθεια, συσχέτιση με ιστολογικά δεδομένα ίνωσης στο μυοκάρδιο, συσχέτιση με επίπτωση και υποτροπή κολπικής μαρμαρυγής μετά από κατάλυση, συσχέτιση με στένωση αορτικής βαλβίδας και με ρευματικής αιτιολογίας βαλβιδοπάθειες • PIIINP: Αντανakλά τη μετατροπή του προκολλαγόνου ΙΙΙ σε κολλαγόνο ΙΙΙ, συσχέτιση με παθοφυσιολογία αορτικών ανευρυσμάτων, συσχέτιση με τη σοβαρότητα της στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς χωρίς ίνωση του μυοκαρδίου, • Πιθανό θεραπευτικό όφελος από χορήγηση θεραπειών (πχ. αναστολείς αλατοκορτικοειδών) που μειώνουν τα επίπεδα PICP σύμφωνα με μελέτες για την καρδιακή ανεπάρκεια, το μεταβολικό σύνδρομο • Μέτρηση στο περιφερικό αίμα με τη βοήθεια ανοσολογικών μεθόδων (πχ. RIA)
<p><i>Λεπτίνη [680-688]</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> • Μη-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη (16 kDa) που εκκρίνεται κυρίως από τον λιπώδη ιστό, τα επίπεδά της αυξάνονται με την αύξηση του λιπώδους ιστού

- Ορμόνη (αδιποκίνη) με πλειοτρόπες δράσεις σχετιζόμενες με την παραγωγή ενέργειας, τη θερμογένεση, τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και τους ανοσολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της παχυσαρκίας, αυξάνει την έκφραση των μορίων που καταστέλλουν την όρεξη και μειώνει την έκφραση των ορεξιογόνων μορίων στον υποθάλαμο, συμμετέχει στην παλίνδρομη ρύθμιση υποθαλάμου-υπόφυσης και ποικίλων ενδοκρινικών στόχων
- Η έλλειψή της σχετίζεται με την παθοφυσιολογία του σακχαρώδους διαβήτη και της παχυσαρκίας, παρόλα αυτά, οι αυξημένες τιμές ειδικά στα πλαίσια της παχυσαρκίας έχουν δυσμενείς καρδιαγγειακές επιδράσεις («παράδοξο της λεπτίνης», πιθανώς λόγω ανάπτυξης αντίστασης στη δράση της λεπτίνης) και συγκεκριμένα σχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε στεφανιαίους ασθενείς και με αυξημένη αρτηριακή σκληρία, με διαταραχή του μεταβολικού προφίλ και εμφάνιση αρτηριακής υπέρτασης
- Πιθανό θεραπευτικό όφελος από την μείωση των τιμών της λεπτίνης στις καταστάσεις υπερλεπτιναιμίας με τη χορήγηση θεραπειών, ωστόσο απαιτούνται περισσότερα δεδομένα
- Μετράται στο αίμα με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών μεθόδων (πχ. RIA)

Adiponectin [689-696]

- Ορμόνη 30-kDa (αδιποκίνη, ιδιαίτερα σημαντική για το καρδιαγγειακό σύστημα είναι η πολυμερής μορφή της υψηλού μοριακού βάρους) που εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό και συμμετέχει στη ρύθμιση της παραγωγής και καταπόνησης ενέργειας από το λιπώδη ιστό (πρόσληψη τροφής και καταβολισμός λιπιδίων και υδατανθράκων), ασκεί ευεργετικές δράσεις σε πλειάδα κυτταρικών στόχων όπως αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, αντι-ινωτικές και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις
- Τα επίπεδά της καθορίζονται από την ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή και την απέκκρισή της, έχει αντίστροφη σχέση με τη μάζα του λιπώδους ιστού και με τις τιμές της λεπτίνης
- Χαμηλές τιμές αδιπονεκτίνης στα πλαίσια της παχυσαρκίας, του σακχαρώδους διαβήτη και της στεφανιαίας νόσου σχετίζονται με δυσμενή καρδιαγγειακή έκβαση
- «Παράδοξο της αδιπονεκτίνης»: Αυξημένες τιμές της σε ασθενείς με καρδιαγγειακές διαταραχές (πχ. προχωρημένη καρδιακή ανεπάρκεια) δικαιολογούνται λόγω της δυσλειτουργίας του λιπώδους ιστού και της επακόλουθης μείωσης της απομάκρυνσής της από την αιματική κυκλοφορία
- Διάφορες θεραπευτικές προσπάθειες και στρατηγικές απώλειας βάρους έχουν προσπαθήσει να αυξήσουν τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης στα φυσιολογικά επίπεδα και το λόγο αδιπονεκτίνης/λεπτίνης
- Μετράται στο αίμα με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών τεχνικών (πχ. ELISA)

Copeptin [697-709]

- Είναι το καρβοξυτελικό τμήμα της pro-AVP (CT-proAVP), απελευθερώνεται μαζί με την AVP (αντιδιουρητική ορμόνη) στα αρχικά στάδια επεξεργασίας της, πρόκειται για γλυκοζυλιωμένο πεπτίδιο 39 αμινοξέων, είναι σταθερότερο μόριο από την αντιδιουρητική ορμόνη, εκκρίνεται από τον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης σε συνθήκες υπότασης και ως απάντηση στις μεταβολές της ωσμωτικότητας του ορού

- Τα επίπεδά της δε μεταβάλλονται με την ηλικία, πολύ χαμηλές τιμές κοπεπτίνης σε ασθενείς με άποιο διαβήτη και πολύ υψηλές σε ασθενείς με σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης
- Αύξηση των τιμών της και συσχέτιση με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, στην οξεία και τη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, συσχέτιση με το βαθμό της δυσλειτουργίας του μυοκαρδίου και την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας, συσχέτιση με τη σοβαρότητα του αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδείου, συσχέτιση με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη και τη σοβαρότητα των επιπλοκών του (πρόβλεψη του κινδύνου για ακρωτηριασμό και εμφάνιση διαβητικής νεφροπάθειας), με το μεταβολικό σύνδρομο και την λιπώδη διήθηση του ήπατος, την αθηρωμάτωση των στεφανιαίων αγγείων και την αρτηριακή σκληρία, τη θνητότητα μετά από πνευμονική εμβολή
- Μέτρηση στο αίμα με τη βοήθεια ανοσοενζυμικών τεχνικών (πχ. ELISA) και με τεχνικές ανοσοφθορισμού

Cyclatin C [710-720]

- Πρωτείνη 12 kDa (122 αμινοξέων, ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων των πρωτεϊνικών κυστεϊνών), διηθείται ελεύθερα από το νεφρό, σε αντίθεση με την κρεατινίνη δεν επηρεάζεται από τη μυϊκή μάζα, την ηλικία και το φύλο, αυξάνεται νωρίτερα από την κρεατινίνη και εκτιμά το ρυθμό σπειραματικής κάθαρσης περισσότερο αξιόπιστα
- Συσχέτιση με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, συμμετοχή στους μηχανισμούς της φλεγμονής, του οξειδωτικού στρες και της αθηροσκλήρυνσης
- Προγνωστική ικανότητα για δυσμενή καρδιαγγειακά συμβάματα, θνητότητα από καρδιαγγειακά αίτια και από κάθε αιτία σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, προγνωστική ικανότητα για καρδιαγγειακά συμβάματα σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο (ιδίως όταν αξιολογείται μαζί με την αλβουμινουρία), αυξημένη προγνωστική ικανότητα σε ασθενείς βαρέως πάσχοντες, συσχέτιση με την επιδείνωση της μυοκαρδιακής λειτουργίας μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου και την πρόγνωση των ασθενών με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια
- Μέτρηση με τη βοήθεια ανοσολογικών μεθόδων (πχ. nephelometric immunoassay, turbidometric immunoassay)

Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (EPCs) [721-729]

- Ενδοθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών ή τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα ή από τον έξω αγγειακό χιτώνα (δυνατότητα ανοσολογικής επιτήρησης και διακίνησης φλεγμονωδών κυττάρων δια των vasa vasorum), ποικιλία εκφραζόμενων μορίων CD (clusters of differentiation)
- Συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης της ενδοθηλιακής βλάβης, στην αναγέννηση του ενδοθηλίου και τη νεοαγγειογένεση, μετακινούμενα επί των αγγειακών βλαβών ή ασκώντας παρακρινείς δράσεις
- Έμμεσος δείκτης αγγειακής δυσλειτουργίας, συσχέτιση με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τους βιοδείκτες ενδοθηλιακής βλάβης, μειωμένα σε αριθμό ή σε λειτουργικότητα σε μια σειρά καρδιαγγειακών παθήσεων (πχ. στεφανιαία νόσος, αρτηριακή υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, κάπνισμα, σακχαρώδη διαβήτη, γήρανση)

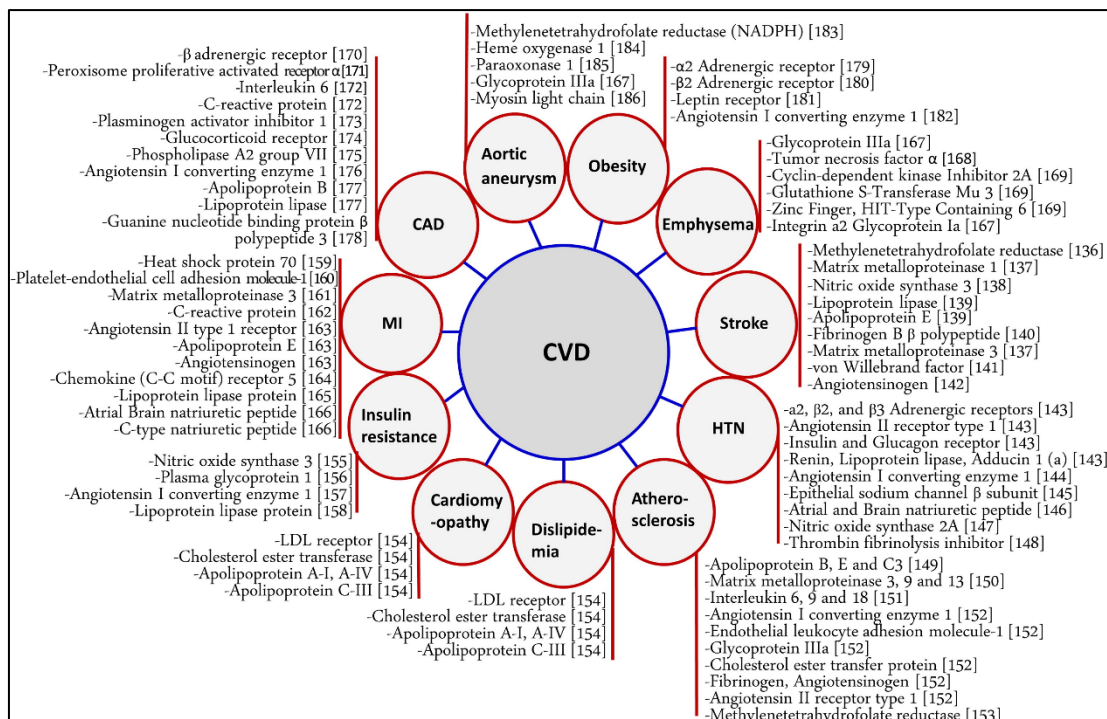
- Πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι υπό μελέτη για την αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων (πχ. ισχαιμική καρδιακή νόσος, καρδιακή ανεπάρκεια, πνευμονική αρτηριακή υπέρταση), ομαλοποίηση των τιμών ή της λειτουργίας τους μετά από αντιμετώπιση παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου
- Αξιολόγηση EPCs συνηθέστερα μετά από αιμοληψία περιφερικού φλεβικού αίματος, φυγοκέντρηση και καλλιέργεια σε ειδικά μέσα, και ανίχνευση των εμφραζόμενων μορίων διαφοροποίησης CD με κυτταρομετρία ροής

Microparticles (MP) [730-740]

- Κυστίδια (απύρηνα) που περικλείουν ενεργά βιομόρια (πχ. πρωτείνες, mRNA, μιτοχόνδρια, μεμβρανικούς υποδοχείς κλπ) και κυτταροπλασματικό υλικό και περιβάλλονται από μια στοιβάδα φωσφολιπιδίων, προέρχονται από ποικιλία κυττάρων (ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια, ερυθρά αιμοσφαίρια, καρκινικά κύτταρα) και συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος (ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, θρόμβωση, φλεγμονή, απόπτωση, επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων), ποικιλία μεγέθους, περιεχόμενου υλικού και τρόπου παραγωγής τους που σχετίζεται με το κύτταρο προέλευσής τους (κατηγοριοποιούνται στα εξωσώματα και τα εκτοσώματα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία)
- Απελευθερώνονται μετά από φυσιολογικά και μη-φυσιολογικά ερεθίσματα με εξωκυττάρωση (πχ. διατμητική τάση, παρουσία προφλεγμονωδών κυτταροκινών, κυκλοφορίας προ-θρομβωτικών μορίων, βιοδεικτών οξειδωτικού στρες)
- Συσχέτιση με τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου και την πρόγνωση των ασθενών, συμμετοχή στην παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης και των επιπλοκών της, στην αγγειογένεση και στη ρύθμιση της ενδοθηλιακής λειτουργίας (πχ. έλεγχος του αγγειακού τόνου), συσχέτιση με την καρδιακή ανεπάρκεια, κολπική μαρμαρυγή, περιφερική αγγειοπάθεια, πνευμονική υπέρταση
- Μεταβολή των τιμών τους μετά από χορήγηση θεραπείας (αντι-υπερτασική, υπολιπιδαιμική, αντιδιαβητική και αντιαιμοπεταλιακή αγωγή)
- Ανίχνευση και μέτρηση στο αίμα με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής

6. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι εξελίξεις στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας και της έρευνας έχουν δώσει τη δυνατότητα μελέτης μιας πληθώρας γενετικών δεικτών (Εικόνα 17) με σκοπό τη διερεύνηση της χρήσης τους για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η μελέτη των γενετικών παραμέτρων που αφορούν το καρδιαγγειακό σύστημα γίνεται με τις μεθόδους GWAS (Genome-wide association studies, μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος), ενώ νεότερα δεδομένα έχουν προκύψει από τις μεθοδολογίες αλληλούχησης RNA και τις πλατφόρμες πρωτεωμικής και μεταβολομικής [741]. Ορισμένοι γενετικοί δείκτες (μελέτες φαρμακογενετικής) δίνουν τη δυνατότητα ελέγχου της αποτελεσματικότητας των χορηγούμενων φαρμακευτικών παραγόντων [742]. Άλλα παραδείγματα αφορούν τη μελέτη πολυμορφισμών γονιδίων (SNPs), της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) καθώς επίσης η μελέτη νεότερων μοριακών δεικτών όπως τα μη κωδικοποιά μόρια RNA (ncRNA), τα οποία έχουν ρυθμιστικές δράσεις σχετικά με τη γονιδιακή έκφραση [743-746]. Απώτερος σκοπός της γνώσης των γενετικών παραμέτρων που καθορίζουν την προδιάθεση για τη νόσο αποτελεί η προσπάθεια για εξατομικευμένη διάγνωση και θεραπεία των ασθενών με καρδιαγγειακά νοσήματα, των ατόμων σε κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα και των οικογενειών τους (εξατομικευμένη ιατρική) [747]. Παρόλα αυτά, δεν θα πρέπει να λησμονείται ότι η γνώση των γενετικών χαρακτηριστικών θα πρέπει να συμπορεύεται με τους κανόνες της Βιοηθικής για τη διαφύλαξη των προσωπικών πληροφοριών των ατόμων και παράλληλα θα πρέπει να γίνουν προσπάθειες για μείωση του κόστους του γενετικού ελέγχου ώστε να γίνει περισσότερο οικονομικά προσιτός [213].



Εικόνα 17: Γενετικοί βιοδείκτες καρδιαγγειακού συστήματος [748].

Στο σημείο αυτό θα παρουσιασθούν παραδείγματα γενετικών πολυμορφισμών και μεταλλάξεων γονιδίων του καρδιαγγειακού συστήματος (Πίνακας 2), παραδείγματα γενετικών τόπων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων του καρδιαγγειακού συστήματος (Πίνακας 3) και στη συνέχεια θα παρουσιασθούν (συνοπτικά) ερευνητικά δεδομένα για τα ncRNA που εμπλέκονται στις παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος και ιδίως για τα microRNA.

Υπάρχει πληθώρα ερευνητικών δεδομένων σχετικά με πολυμορφισμούς γονιδίων όπου οι SNPs άλλοτε οδηγούν σε αύξηση της λειτουργίας ενός γονιδίου και άλλοτε σε μειωμένη λειτουργικότητά του με ποικίλη συμμετοχή σε καρδιολογικά νοσήματα (Πίνακας 2). Μάλιστα, η συνεκτίμησή τους μαζί με κλινικές πληροφορίες θα μπορούσε να διευκολύνει την ανάδειξη των ασθενών ή των ατόμων σε αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, που θα μπορούσαν να ωφεληθούν από χορήγηση θεραπείας νωρίτερα (πχ. στατίνες) για τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου [749].

Πίνακας 2: Γενετικοί πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις που σχετίζονται με νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος

Γονίδιο	Γενετικός Δείκτης	Περιγραφή λειτουργίας
Αναγωγή του μεθυλενοτετραυδροφυλλικού (MTHFR) [750]	rs1801133, αλληλίο T (ομόζυγη/ετερόζυγη μορφή)	Μειωμένα επίπεδα φυλλικού οξέος, αύξηση τιμών ομοκυστεΐνης και κινδύνου για αγγειακές θρομβώσεις
Μετάλλαξη υποδοχέα LDL [751]	Ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση	Οικογενής υπερχοληστερολαιμία και αυξημένος καρδιαγγειακός κίνδυνος
ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) [752]	rs1883025, αλληλίο A	Μειωμένες τιμές HDL χοληστερόλης
PCSK9 [753]	Nonsense μεταλλάξεις (Y142X και C679X), συχνές σε άτομα Αφρικανοαμερικανικής καταγωγής	Συσχέτιση με μειωμένες τιμές LDL κατά 40%
Γονίδιο PCSK9 [754]	rs2479415	Σχετίζεται με αυξημένες τιμές PCSK9
Γονίδιο του υποδοχέα LDL [755]	rs6511720 και rs57217136	Συσχέτιση με αυξημένη έκφραση του υποδοχέα LDL και με κατά 12% μειωμένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο
Zinc finger protein 259 (ZNF259) [756]	rs964184, αλληλίο G	Συσχέτιση με αυξημένες τιμές LDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σε άτομα με μεταβολικό σύνδρομο
Γονίδιο NF-κΒ1 [757]	rs28362491, αλληλίο D	Αύξηση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο

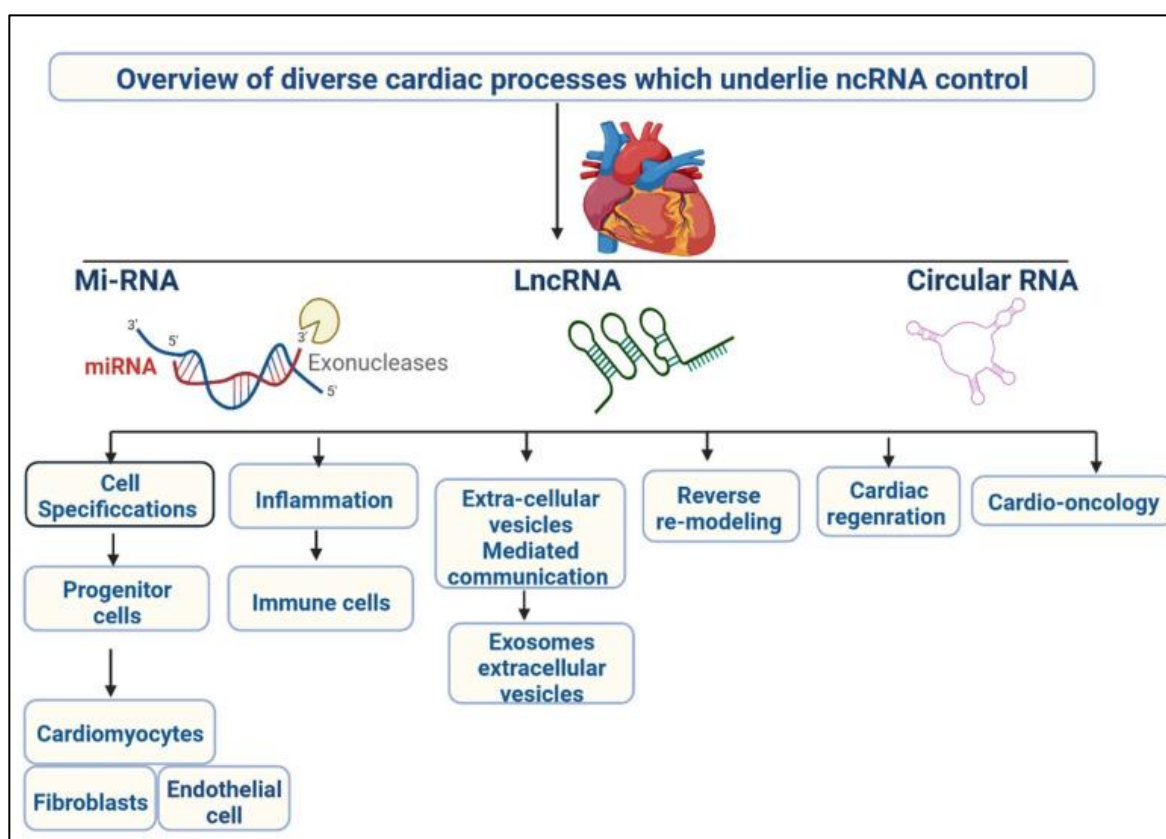
Γονίδιο ενδοθηλιακής συνθετάσης NOS3 [758]	Πολυμορφισμός Glu298Asp	Συσχέτιση με τον κίνδυνο για οξεία στεφανιαία σύνδρομα και πρωιμή στεφανιαία νόσο
Γονίδιο της glutathione peroxidase 4 (GPX4) [759]	rs713041, T αλλήλιο	Αυξημένος κίνδυνος για εγκεφαλικό και υπέρταση
Γονίδιο MMP-9 [760]	rs3918242, γονότυπος CC	Συσχέτιση με τον κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου
Γονίδιο IL-6 [761]	rs1800795, -174 G/C	Αυξημένος κίνδυνος για στεφανιαία νόσο ειδικά σε άτομα Ασιατικής καταγωγής
Γονίδιο ADAMTS7 [762]	rs3825807, αλλήλιο A	Αυξημένος κίνδυνος για στεφανιαία νόσο
Γονίδιο TNF-α [763]	TNF-α-308 G/A και -238 G/A	Συσχέτιση με τον κίνδυνο για διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια
Γονίδια B-Myosin Heavy Chain 7 (MYH7) και Myosin-Binding Protein C 3 (MYBPC3) [764]	Μεταλλάξεις που αλλάζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης	Έχουν τη μεγαλύτερη συμμετοχή στην παθοφυσιολογία της υπερτροφικής μυοκαρδιοπάθειας

Σύμφωνα με τα επιστημονικά δεδομένα διάφοροι γονιδιακοί τόποι επηρεάζουν τις παραμέτρους που εμπλέκονται στη δράση φαρμακευτικών σκευασμάτων και συγκεκριμένα τις παραμέτρους φαρμακοκινητικής (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, κάθαρση φαρμάκων) και φαρμακοδυναμικής (αλληλεπίδρασης του φαρμάκου ή των μεταβολιτών του με άλλα μόρια-στόχους) εντός του οργανισμού [765]. Μάλιστα, ειδικά για ορισμένα φάρμακα είναι απαραίτητος ο μεταβολισμός τους σε ενεργά μόρια ώστε να έχουν την επιθυμητή δράση εντός του οργανισμού, ενώ για άλλα φάρμακα οι γενετικές παράμετροι καθορίζουν την αποβολή του από τον οργανισμό και συνεπώς τα επίπεδά του [766]. Επομένως, η κατανόηση αυτών των επιδράσεων μπορεί να βοηθήσει στην επίτευξη καλύτερης αποτελεσματικότητας για τις χορηγούμενες θεραπείες, να καθοδηγήσει τις θεραπευτικές αποφάσεις και μπορεί να βοηθήσει στην περαιτέρω έρευνα για νέα φάρμακα (Πίνακας 3) [765].

Πίνακας 3: Φαρμακογονιδιωματική και καρδιαγγειακό σύστημα

Φάρμακο	Γενετικός Δείκτης	Αποτέλεσμα
Αναστολείς HMG-CoA αναγωγάσης (πραβαστατίνη) [767]	SNP 12, SNP 29 του γονιδίου HMG-CoA αναγωγάσης, ετερόζυγη κατάσταση	Μειωμένη δραστηριότητα κατά 22% για την ολική χοληστερόλη και κατά 19% για την LDL
Αναστολείς HMG-CoA αναγωγάσης [768]	SNP rs4363657 του γονιδίου <i>SLCO1B1</i> (συμμετέχει στην πρόσληψη των στατινών από το ήπαρ)	Συσχέτιση του αλληλίου C (περισσότερο οι ομοζυγώτες) με αυξημένο κίνδυνο για μυοπάθεια μετά από λήψη στατινών
Αναστολείς HMG-CoA αναγωγάσης (μελέτη σε διαβητικούς ασθενείς) [769]	APOE απότυποι E2 και E4	Ομοζυγώτες E2 vs. E4 είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές LDL χοληστερόλης ανεξάρτητα από παράγοντες κινδύνου
Κλοπιδογρέλη (αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας) [770]	CYP2C19 loss of function variant	Ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για το γονίδιο: αυξημένος κίνδυνος για θρόμβωση του στεντ μετά από αγγειοπλαστική και αυξημένος κίνδυνος για καρδιαγγειακά συμβάματα
Κλοπιδογρέλη (αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας) [771]	CYP2C19*17 αλλήλιο	Αυξημένος αιμορραγικός κίνδυνος μετά από αγγειοπλαστική σε ομόζυγους και ετερόζυγους, όχι επίδραση στον κίνδυνο για θρόμβωση του στεντ
Warfarin (αντιπηκτικό) [772]	CYP2C9*2 και CYP2C9*3 (συμμετέχουν στο μεταβολισμό του εναντιομερούς S-warfarin)	Αυξημένος κίνδυνος για αιμορραγία, ανάγκη για χαμηλότερες δοσολογίες και τακτική αιματολογική παρακολούθηση
Warfarin (αντιπηκτικό) [773]	Πολυμορφισμός του γονιδίου VKORC1 (G-1639A)	Αυξημένος κίνδυνος για αιμορραγία και ανάγκη για χαμηλότερη δοσολογία του φαρμάκου

Ένα πεδίο έρευνας με ευρείες προεκτάσεις για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι η μελέτη των μη κωδικών RNA (ncRNA) (Εικόνα 18), τα οποία αποτελούν το 98.5% του συνολικού γονιδιώματος και, παρότι δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, επιτελούν ρυθμιστικές δράσεις που σχετίζονται με τη νόσο. Τα ncRNA ανήκουν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθός τους: τα μικρού μεγέθους (19-25 νουκλεοτίδια), τα ενδιάμεσου μεγέθους (20-200 νουκλεοτίδια) και τα μεγάλου μεγέθους (>200 νουκλεοτίδια) [746]. Στα μικρού μεγέθους ανήκουν τα microRNA (miRNA), τα small interfering RNA (siRNA) και τα piwi-interacting RNA (piRNA) και στα μεσαίου μεγέθους ανήκουν τα small nucleolar RNAs (snoRNAs) και τα small nuclear RNAs (snRNAs) [746]. Τα long ncRNAs είναι περισσότερο ετερογενή μόρια και χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: bidirectional, enhancer, sense, antisense, intergenic και intron long ncRNAs [774]. Τέλος, στα ncRNA ανήκουν και τα κυκλικά RNA (circRNAs), τα οποία συνιστούν μονόκλωνα, κυκλικά μόρια RNA με μεγαλύτερη σταθερότητα που συμμετέχουν σε ρυθμιστικές δράσεις επί των γονιδίων-στόχων ή άλλων miRNA [775].

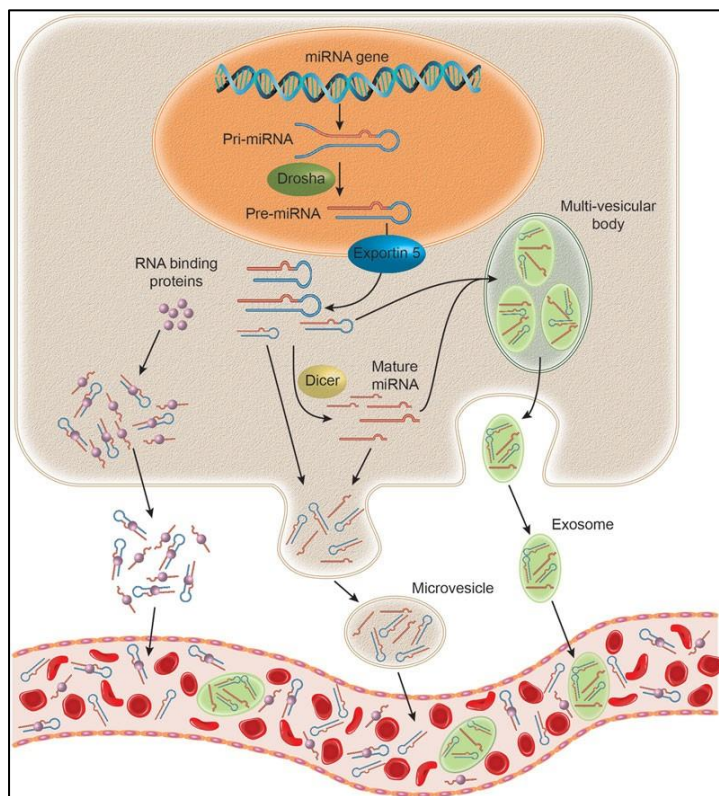


Εικόνα 18: Non coding RNAs και καρδιαγγειακά νοσήματα [776].

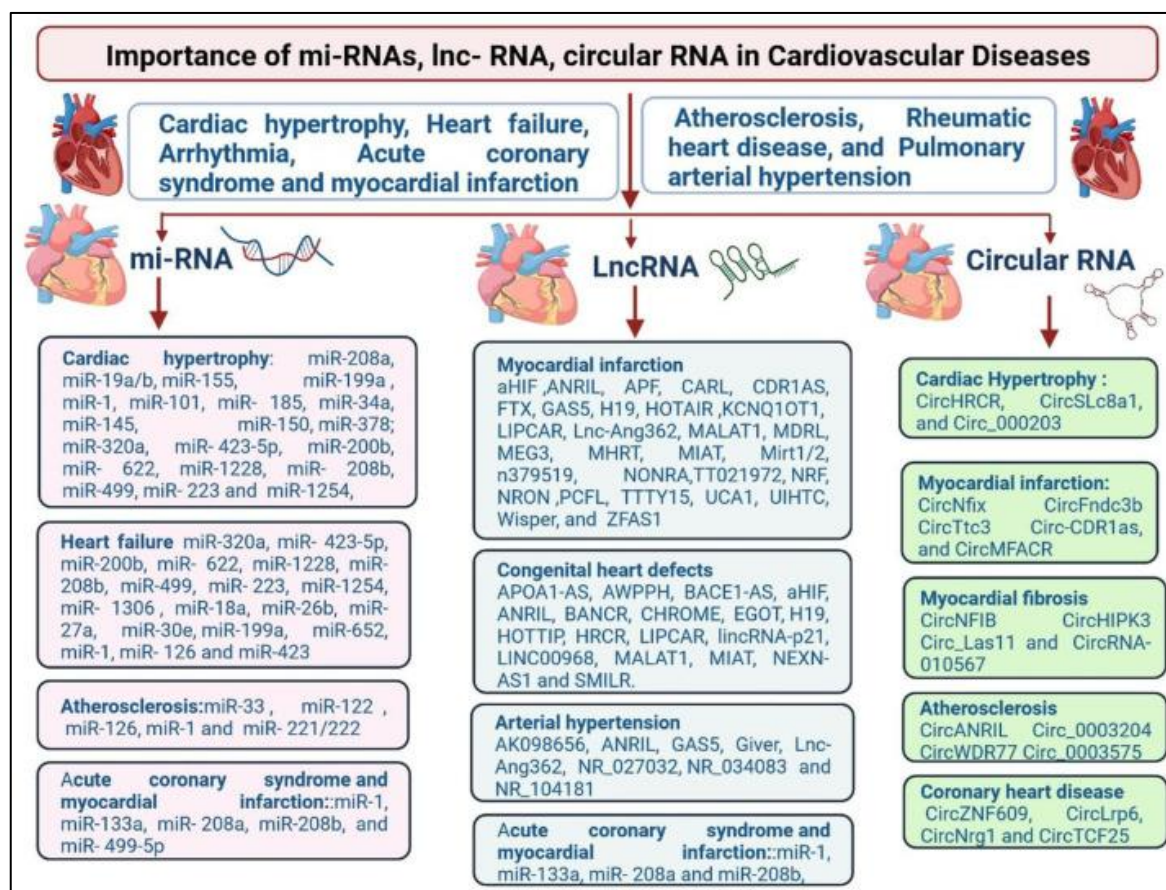
Τα miRNA (Εικόνα 19) είναι ολιγονουκλεοτιδικά μόρια (~22 νουκλεοτίδια) που συμμετέχουν στην αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης είτε στοχεύοντας το mRNA-στόχο (3'-αμετάφραστη περιοχή του) είτε αποδομώντας το ενώ μπορούν να έχουν περισσότερα από ένα μόρια-στόχους [777, 778]. Αρχικά τα miRNA μεταγράφονται στον πυρήνα ως pri-miRNA και έχουν 5' καλύπτρα και 3'-πολυΑ ουρά, που εν συνεχεία αφαιρούνται, και τελικά παράγονται τα ώριμα miRNA. Αυτά είτε προσδένονται σε πρωτεΐνες και εκκρίνονται

από τα κύτταρα, είτε πακετάρονται σε μικροκυστίδια και σε εξωσώματα ώστε να προστατευθούν από αποδόμηση από RNases και εν συνεχεία απελευθερώνονται ως κυκλοφορούντα μόρια [779]. Κατόπιν, τα pre-miRNA και τα ώριμα miRNA ενδοκυτταρώνονται μετά από πρόσδεση σε μεμβρανικούς υποδοχείς είτε μέσω σύντηξης με την μεμβράνη [780]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ένα miRNA μπορεί να έχει διαφορετική δράση ανάλογα με τον εκφραζόμενο ιστό [781]. Επιπλέον, η παραγωγή τους γίνεται από πληθώρα κυττάρων (πχ. ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια, ερυθρά αιμοσφαίρια, κύτταρα του ανοσολογικού μηχανισμού κ.ά.) [782]. Τέλος, ένα νέο πεδίο έρευνας αποτελεί η μελέτη των μιτοχονδριακών miRNA, δεδομένης της συμμετοχής των μιτοχονδρίων στους μηχανισμούς ενέργειας, στη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες [783].

Η βιβλιογραφία για τα miRNA είναι εκτενής (Εικόνα 20) και συνοπτικά στο σημείο αυτό παρατίθεται εικόνα που συνοψίζει μόρια miRNA που συμμετέχουν σε καρδιαγγειακά νοσήματα, ενώ τονίζεται ότι τα miRNA συμμετέχουν σε κοινές παθοφυσιολογικές διαδικασίες των νοσημάτων που έχουν περιγραφεί (οξειδωτικό στρες, φλεγμονή, ενδοθηλιακή λειτουργία, μεταβολισμός των λιπιδίων, απόπτωση και κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ίνωση) [784, 785]. Ωστόσο, αν και υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα σχετικά με τη συσχέτισή τους με καρδιολογικά νοσήματα, την πρόγνωση και την πιθανή θεραπεία τους (πχ. έμφραγμα του μυοκαρδίου, καρδιακή ανεπάρκεια, αρρυθμίες), δεν έχει τεκμηριωθεί ισχυρά και για το λόγο αυτό απαιτούνται περισσότερες μελέτες καθώς οι μεταβολές των miRNA συμβαίνουν και σε άλλες παθήσεις (πχ. κακοήθη νοσήματα, λοιμώξεις, χορήγηση φαρμάκων) [786]. Συν τοις άλλοις, τα αποτελέσματα των μελετών χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια εν πολλοίς λόγω διαφορών στις μεθοδολογίες μέτρησης των miRNA και αυτό διότι έχει διαπιστωθεί ότι τα miRNA που μετρώνται σε δείγμα από το πλάσμα έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι αυτά που μετρώνται στον ορό στα πλαίσια της απελευθέρωσής τους από τα αιμοπετάλια [787].



Εικόνα 19: Βιογένεση των κυκλοφορούντων microRNA [786].



Εικόνα 20: Παραδείγματα ncRNA που σχετίζονται με καρδιαγγειακά νοσήματα [776].

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν μια μεγάλη ομάδα διαταραχών που ευθύνονται για σημαντικό μερίδιο νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Στις πιο συχνές διαταραχές ανήκουν η στεφανιαία νόσος, η καρδιακή ανεπάρκεια, η αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι διάφορες μορφές δυσλιπιδαιμίας και η κολπική μαρμαρυγή. Η αναγνώριση των ατόμων σε κίνδυνο για καρδιαγγειακά επεισόδια είναι σημαντική διότι η έγκαιρη διάγνωση μπορεί να καθυστερήσει την πρόκληση περαιτέρω μυοκαρδιακής βλάβης μέσω χορήγησης θεραπείας και συμβουλευτικής, ενώ εξίσου σημαντική είναι η αντιμετώπιση των πασχόντων όπως ορίζουν οι κατευθυντήριες οδηγίες, οι οποίες έχουν στηριχθεί σε πληθώρα ερευνητικών δεδομένων από κλινικές μελέτες και μετα-αναλύσεις. Μέχρι σήμερα αρκετοί κυκλοφορούντες βιοδείκτες έχουν λάβει έγκριση για τη διάγνωση, την εκτίμηση της πρόγνωσης και την καθοδήγηση της θεραπείας των καρδιαγγειακών νοσημάτων, με κυρίαρχη θέση αυτή των νατριουρητικών πεπτιδίων για την καρδιακή ανεπάρκεια, των τροπονινών για τη διάγνωση της μυοκαρδιακής βλάβης και ειδικά για την τεκμηρίωση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Ωστόσο, ο κατάλογος των βιοδεικτών είναι μεγάλος και ένα πεδίο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι αυτό των γενετικών δεικτών όπως τα non coding RNA που, παρότι δεν εκφράζουν γνωστά μόρια, συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με σύνθετες δράσεις. Επιπλέον, ένα ενδιαφέρον πεδίο με θεραπευτικές προεκτάσεις είναι η μελέτη των γενετικών παραμέτρων που καθορίζουν την απάντηση στις χορηγούμενες φαρμακευτικές θεραπείες. Απώτερος σκοπός από τη χρήση των κυκλοφορούντων βιοδεικτών, συμπεριλαμβανομένων των απεικονιστικών τεχνικών του καρδιαγγειακού συστήματος, των πηγών δεδομένων μέσω των εξελίξεων στον τομέα της τεχνητής νοημοσύνης και των αναλυτικών τεχνικών αποτελεί η εξατομικευμένη παροχή ιατρικής φροντίδας.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ακολουθούν οι βιβλιογραφικές αναφορές (πηγές) της Εργασίας.

1. Timmis, A.; Vardas, P.; Townsend, N.; Torbica, A.; Katus, H.; De Smedt, D.; Gale, C. P.; Maggioni, A. P.; Petersen, S. E.; Huculeci, R.; Kazakiewicz, D.; de Benito Rubio, V.; Ignatiuk, B.; Raisi-Estabragh, Z.; Pawlak, A.; Karagiannis, E.; Treskes, R.; Gaita, D.; Beltrame, J. F.; McConnachie, A.; Bardinet, I.; Graham, I.; Flather, M.; Elliott, P.; Mossialos, E. A.; Weidinger, F.; Achenbach, S.; Atlas Writing Group, E. S. o. C., European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J* **2022**, *43* (8), 716-799.
2. Byrne, R. A.; Rossello, X.; Coughlan, J. J.; Barbato, E.; Berry, C.; Chieffo, A.; Claeys, M. J.; Dan, G. A.; Dweck, M. R.; Galbraith, M.; Gilard, M.; Hinterbuchner, L.; Jankowska, E. A.; Juni, P.; Kimura, T.; Kunadian, V.; Leosdottir, M.; Lorusso, R.; Pedretti, R. F. E.; Rigopoulos, A. G.; Rubini Gimenez, M.; Thiele, H.; Vranckx, P.; Wassmann, S.; Wenger, N. K.; Ibanez, B.; Group, E. S. C. S. D., 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *Eur Heart J* **2023**, *44* (38), 3720-3826.
3. Knuuti, J.; Wijns, W.; Saraste, A.; Capodanno, D.; Barbato, E.; Funck-Brentano, C.; Prescott, E.; Storey, R. F.; Deaton, C.; Cuisset, T.; Agewall, S.; Dickstein, K.; Edvardsen, T.; Escaned, J.; Gersh, B. J.; Svitil, P.; Gilard, M.; Hasdai, D.; Hatala, R.; Mahfoud, F.; Masip, J.; Muneretto, C.; Valgimigli, M.; Achenbach, S.; Bax, J. J.; Group, E. S. C. S. D., 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J* **2020**, *41* (3), 407-477.
4. Crea, F.; Libby, P., Acute Coronary Syndromes: The Way Forward From Mechanisms to Precision Treatment. *Circulation* **2017**, *136* (12), 1155-1166.
5. Thygesen, K.; Alpert, J. S.; Jaffe, A. S.; Chaitman, B. R.; Bax, J. J.; Morrow, D. A.; White, H. D.; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology /American College of Cardiology /American Heart Association /World Heart Federation Task Force for the Universal Definition of Myocardial I., Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol* **2018**, *72* (18), 2231-2264.
6. Reriani, M. K.; Flammer, A. J.; Jama, A.; Lerman, L. O.; Lerman, A., Novel functional risk factors for the prediction of cardiovascular events in vulnerable patients following acute coronary syndrome. *Circ J* **2012**, *76* (4), 778-83.
7. Sessa, W. C., eNOS at a glance. *J Cell Sci* **2004**, *117* (Pt 12), 2427-9.
8. Bonetti, P. O.; Lerman, L. O.; Lerman, A., Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**, *23* (2), 168-75.
9. Gimbrone, M. A., Jr.; Garcia-Cardena, G., Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* **2016**, *118* (4), 620-36.
10. Sary, H. C., Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, *20* (5), 1177-8.
11. Tabas, I.; Garcia-Cardena, G.; Owens, G. K., Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* **2015**, *209* (1), 13-22.
12. Wang, C.; Baker, B. M.; Chen, C. S.; Schwartz, M. A., Endothelial cell sensing of flow direction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2013**, *33* (9), 2130-6.
13. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **1999**, *340* (2), 115-26.

14. Pober, J. S.; Sessa, W. C., Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* **2007**, 7 (10), 803-15.
15. Wang, B.; Zhang, M.; Takayama, T.; Shi, X.; Roenneburg, D. A.; Kent, K. C.; Guo, L. W., BET Bromodomain Blockade Mitigates Intimal Hyperplasia in Rat Carotid Arteries. *EBioMedicine* **2015**, 2 (11), 1650-61.
16. Rollins, B. J.; Yoshimura, T.; Leonard, E. J.; Pober, J. S., Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* **1990**, 136 (6), 1229-33.
17. Libby, P.; Ordovas, J. M.; Auger, K. R.; Robbins, A. H.; Birinyi, L. K.; Dinarello, C. A., Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol* **1986**, 124 (2), 179-85.
18. Hansson, G. K.; Libby, P., The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **2006**, 6 (7), 508-19.
19. Koskinas, K. C.; Feldman, C. L.; Chatzizisis, Y. S.; Coskun, A. U.; Jonas, M.; Maynard, C.; Baker, A. B.; Papafaklis, M. I.; Edelman, E. R.; Stone, P. H., Natural history of experimental coronary atherosclerosis and vascular remodeling in relation to endothelial shear stress: a serial, in vivo intravascular ultrasound study. *Circulation* **2010**, 121 (19), 2092-101.
20. Chatzizisis, Y. S.; Jonas, M.; Coskun, A. U.; Beigel, R.; Stone, B. V.; Maynard, C.; Gerrity, R. G.; Daley, W.; Rogers, C.; Edelman, E. R.; Feldman, C. L.; Stone, P. H., Prediction of the localization of high-risk coronary atherosclerotic plaques on the basis of low endothelial shear stress: an intravascular ultrasound and histopathology natural history study. *Circulation* **2008**, 117 (8), 993-1002.
21. Kolodgie, F. D.; Gold, H. K.; Burke, A. P.; Fowler, D. R.; Kruth, H. S.; Weber, D. K.; Farb, A.; Guerrero, I. J.; Hayase, M.; Kutys, R.; Narula, J.; Finn, A. V.; Virmani, R., Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* **2003**, 349 (24), 2316-25.
22. Theofilis, P.; Oikonomou, E.; Chasikidis, C.; Tsioufis, K.; Tousoulis, D., Pathophysiology of Acute Coronary Syndromes-Diagnostic and Treatment Considerations. *Life (Basel)* **2023**, 13 (7).
23. Nardin, M.; Verdoia, M.; Laera, N.; Cao, D.; De Luca, G., New Insights into Pathophysiology and New Risk Factors for ACS. *J Clin Med* **2023**, 12 (8).
24. Badimon, L.; Badimon, J. J.; Turitto, V. T.; Fuster, V., Role of von Willebrand factor in mediating platelet-vessel wall interaction at low shear rate; the importance of perfusion conditions. *Blood* **1989**, 73 (4), 961-7.
25. Yamamoto, E.; Yonetsu, T.; Kakuta, T.; Soeda, T.; Saito, Y.; Yan, B. P.; Kurihara, O.; Takano, M.; Niccoli, G.; Higuma, T.; Kimura, S.; Minami, Y.; Ako, J.; Adriaenssens, T.; Boeder, N. F.; Nef, H. M.; Fracassi, F.; Sugiyama, T.; Lee, H.; Crea, F.; Kimura, T.; Fujimoto, J. G.; Fuster, V.; Jang, I. K., Clinical and Laboratory Predictors for Plaque Erosion in Patients With Acute Coronary Syndromes. *J Am Heart Assoc* **2019**, 8 (21), e012322.
26. Jia, H.; Abtahian, F.; Aguirre, A. D.; Lee, S.; Chia, S.; Lowe, H.; Kato, K.; Yonetsu, T.; Vergallo, R.; Hu, S.; Tian, J.; Lee, H.; Park, S. J.; Jang, Y. S.; Raffel, O. C.; Mizuno, K.; Uemura, S.; Itoh, T.; Kakuta, T.; Choi, S. Y.; Dauerman, H. L.; Prasad, A.; Toma, C.; McNulty, I.; Zhang, S.; Yu, B.; Fuster, V.; Narula, J.; Virmani, R.; Jang, I. K., In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol* **2013**, 62 (19), 1748-58.

27. Folco, E. J.; Mawson, T. L.; Vromman, A.; Bernardes-Souza, B.; Franck, G.; Persson, O.; Nakamura, M.; Newton, G.; Luscinskas, F. W.; Libby, P., Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial Cell Activation and Tissue Factor Production Through Interleukin-1 α and Cathepsin G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2018**, *38* (8), 1901-1912.
28. Virmani, R.; Burke, A. P.; Farb, A.; Kolodgie, F. D., Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* **2006**, *47* (8 Suppl), C13-8.
29. Sugane, H.; Kataoka, Y.; Otsuka, F.; Nakaoku, Y.; Nishimura, K.; Nakano, H.; Murai, K.; Honda, S.; Hosoda, H.; Matama, H.; Doi, T.; Nakashima, T.; Fujino, M.; Nakao, K.; Yoneda, S.; Tahara, Y.; Asaumi, Y.; Noguchi, T.; Kawai, K.; Yasuda, S., Cardiac outcomes in patients with acute coronary syndrome attributable to calcified nodule. *Atherosclerosis* **2021**, *318*, 70-75.
30. Yip, A.; Saw, J., Spontaneous coronary artery dissection-A review. *Cardiovasc Diagn Ther* **2015**, *5* (1), 37-48.
31. Radico, F.; Cicchitti, V.; Zimarino, M.; De Caterina, R., Angina pectoris and myocardial ischemia in the absence of obstructive coronary artery disease: practical considerations for diagnostic tests. *JACC Cardiovasc Interv* **2014**, *7* (5), 453-63.
32. Pepine, C. J.; Nichols, W. W., The pathophysiology of chronic ischemic heart disease. *Clin Cardiol* **2007**, *30* (2 Suppl 1), I4-9.
33. Naghavi, M.; Libby, P.; Falk, E.; Casscells, S. W.; Litovsky, S.; Rumberger, J.; Badimon, J. J.; Stefanadis, C.; Moreno, P.; Pasterkamp, G.; Fayad, Z.; Stone, P. H.; Waxman, S.; Raggi, P.; Madjid, M.; Zarrabi, A.; Burke, A.; Yuan, C.; Fitzgerald, P. J.; Siscovick, D. S.; de Korte, C. L.; Aikawa, M.; Juhani Airaksinen, K. E.; Assmann, G.; Becker, C. R.; Chesebro, J. H.; Farb, A.; Galis, Z. S.; Jackson, C.; Jang, I. K.; Koenig, W.; Lodder, R. A.; March, K.; Demirovic, J.; Navab, M.; Priori, S. G.; Rekhater, M. D.; Bahr, R.; Grundy, S. M.; Mehran, R.; Colombo, A.; Boerwinkle, E.; Ballantyne, C.; Insull, W., Jr.; Schwartz, R. S.; Vogel, R.; Serruys, P. W.; Hansson, G. K.; Faxon, D. P.; Kaul, S.; Drexler, H.; Greenland, P.; Muller, J. E.; Virmani, R.; Ridker, P. M.; Zipes, D. P.; Shah, P. K.; Willerson, J. T., From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* **2003**, *108* (14), 1664-72.
34. Lee, T. M.; Lin, M. S.; Tsai, C. H.; Chang, N. C., Effect of ischaemic preconditioning on regional release of inflammatory markers. *Clin Sci (Lond)* **2005**, *109* (3), 267-76.
35. Vanoverschelde, J. L.; Melin, J. A., The pathophysiology of myocardial hibernation: current controversies and future directions. *Prog Cardiovasc Dis* **2001**, *43* (5), 387-98.
36. McDonagh, T. A.; Metra, M.; Adamo, M.; Gardner, R. S.; Baumbach, A.; Bohm, M.; Burri, H.; Butler, J.; Celutkiene, J.; Chioncel, O.; Cleland, J. G. F.; Coats, A. J. S.; Crespo-Leiro, M. G.; Farmakis, D.; Gilard, M.; Heymans, S.; Hoes, A. W.; Jaarsma, T.; Jankowska, E. A.; Lainscak, M.; Lam, C. S. P.; Lyon, A. R.; McMurray, J. J. V.; Mebazaa, A.; Mindham, R.; Muneretto, C.; Francesco Piepoli, M.; Price, S.; Rosano, G. M. C.; Ruschitzka, F.; Kathrine Skibelund, A.; Group, E. S. C. S. D., 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* **2021**, *42* (36), 3599-3726.
37. Parthiban, A.; Shirali, G., Echocardiographic evaluation of the failing heart. *Cardiol Young* **2015**, *25* Suppl 2, 87-93.
38. Follath, F., Ischemic versus non-ischemic heart failure: should the etiology be determined? *Heart Fail Monit* **2001**, *1* (4), 122-5.
39. Marti, C. N.; Georgiopoulou, V. V.; Kalogeropoulos, A. P., Acute heart failure: patient characteristics and pathophysiology. *Curr Heart Fail Rep* **2013**, *10* (4), 427-33.

40. Milo-Cotter, O.; Cotter-Davison, B.; Lombardi, C.; Sun, H.; Bettari, L.; Bugatti, S.; Rund, M.; Metra, M.; Kaluski, E.; Kobrin, I.; Frey, A.; Rainisio, M.; McMurray, J. J.; Teerlink, J. R.; Cotter-Davison, G., Neurohormonal activation in acute heart failure: results from VERITAS. *Cardiology* **2011**, *119* (2), 96-105.
41. Braam, B.; Cupples, W. A.; Joles, J. A.; Gaillard, C., Systemic arterial and venous determinants of renal hemodynamics in congestive heart failure. *Heart Fail Rev* **2012**, *17* (2), 161-75.
42. Njoroge, J. N.; Teerlink, J. R., Pathophysiology and Therapeutic Approaches to Acute Decompensated Heart Failure. *Circ Res* **2021**, *128* (10), 1468-1486.
43. Braunwald, E.; Bristow, M. R., Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* **2000**, *102* (20 Suppl 4), IV14-23.
44. Sato, Y.; Takatsu, Y.; Kataoka, K.; Yamada, T.; Taniguchi, R.; Sasayama, S.; Matsumori, A., Serial circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin (IL)-4, and IL-6 in patients with acute left heart decompensation. *Clin Cardiol* **1999**, *22* (12), 811-3.
45. Kazory, A., Emergence of blood urea nitrogen as a biomarker of neurohormonal activation in heart failure. *Am J Cardiol* **2010**, *106* (5), 694-700.
46. Levin, E. R.; Gardner, D. G.; Samson, W. K., Natriuretic peptides. *N Engl J Med* **1998**, *339* (5), 321-8.
47. Harjola, V. P.; Mullens, W.; Banaszewski, M.; Bauersachs, J.; Brunner-La Rocca, H. P.; Chioncel, O.; Collins, S. P.; Doehner, W.; Filippatos, G. S.; Flammer, A. J.; Fuhrmann, V.; Lainscak, M.; Lassus, J.; Legrand, M.; Masip, J.; Mueller, C.; Papp, Z.; Parissis, J.; Platz, E.; Rudiger, A.; Ruschitzka, F.; Schafer, A.; Seferovic, P. M.; Skouri, H.; Yilmaz, M. B.; Mebazaa, A., Organ dysfunction, injury and failure in acute heart failure: from pathophysiology to diagnosis and management. A review on behalf of the Acute Heart Failure Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* **2017**, *19* (7), 821-836.
48. Ge, Z.; Li, A.; McNamara, J.; Dos Remedios, C.; Lal, S., Pathogenesis and pathophysiology of heart failure with reduced ejection fraction: translation to human studies. *Heart Fail Rev* **2019**, *24* (5), 743-758.
49. Hartupée, J.; Mann, D. L., Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* **2017**, *14* (1), 30-38.
50. Weinberger, M. H.; Aoi, W.; Henry, D. P., Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro. *Circ Res* **1975**, *37* (3), 318-24.
51. Bekheirnia, M. R.; Schrier, R. W., Pathophysiology of water and sodium retention: edematous states with normal kidney function. *Curr Opin Pharmacol* **2006**, *6* (2), 202-7.
52. Braunwald, E., The path to an angiotensin receptor antagonist-neprilysin inhibitor in the treatment of heart failure. *J Am Coll Cardiol* **2015**, *65* (10), 1029-41.
53. Marks, A. R., Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest* **2013**, *123* (1), 46-52.
54. Mann, D. L.; Bristow, M. R., Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* **2005**, *111* (21), 2837-49.
55. Koitabashi, N.; Kass, D. A., Reverse remodeling in heart failure--mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol* **2011**, *9* (3), 147-57.
56. Paulus, W. J.; Tschope, C., A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* **2013**, *62* (4), 263-71.

57. Del Campo, A.; Perez, G.; Castro, P. F.; Parra, V.; Verdejo, H. E., Mitochondrial function, dynamics and quality control in the pathophysiology of HFpEF. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2021**, 1867 (10), 166208.
58. Cavusoglu, Y.; Celik, A.; Altay, H.; Nalbantgil, S.; Ozden, O.; Temizhan, A.; Ural, D.; Unlu, S.; Yilmaz, M. B.; Zoghi, M., Heart failure with non-reduced ejection fraction: Epidemiology, pathophysiology, phenotypes, diagnosis and treatment approaches. *Turk Kardiyol Dern Ars* **2022**, 50 (Suppl), S1-S34.
59. Rickenbacher, P.; Kaufmann, B. A.; Maeder, M. T.; Bernheim, A.; Goetschalckx, K.; Pfister, O.; Pfisterer, M.; Brunner-La Rocca, H. P.; Investigators, T.-C., Heart failure with mid-range ejection fraction: a distinct clinical entity? Insights from the Trial of Intensified versus standard Medical therapy in Elderly patients with Congestive Heart Failure (TIME-CHF). *Eur J Heart Fail* **2017**, 19 (12), 1586-1596.
60. Skyler, J. S.; Bakris, G. L.; Bonifacio, E.; Darsow, T.; Eckel, R. H.; Groop, L.; Groop, P. H.; Handelsman, Y.; Insel, R. A.; Mathieu, C.; McElvaine, A. T.; Palmer, J. P.; Pugliese, A.; Schatz, D. A.; Sosenko, J. M.; Wilding, J. P.; Ratner, R. E., Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes* **2017**, 66 (2), 241-255.
61. Prasad, R. B.; Groop, L., Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes (Basel)* **2015**, 6 (1), 87-123.
62. Butler, A. E.; Janson, J.; Bonner-Weir, S.; Ritzel, R.; Rizza, R. A.; Butler, P. C., Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **2003**, 52 (1), 102-10.
63. Marx, N.; Federici, M.; Schutt, K.; Muller-Wieland, D.; Ajjan, R. A.; Antunes, M. J.; Christodorescu, R. M.; Crawford, C.; Di Angelantonio, E.; Eliasson, B.; Espinola-Klein, C.; Fauchier, L.; Halle, M.; Herrington, W. G.; Kautzky-Willer, A.; Lambrinou, E.; Lesiak, M.; Lettino, M.; McGuire, D. K.; Mullens, W.; Rocca, B.; Sattar, N.; Group, E. S. C. S. D., 2023 ESC Guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes. *Eur Heart J* **2023**, 44 (39), 4043-4140.
64. Knip, M.; Veijola, R.; Virtanen, S. M.; Hyoty, H.; Vaarala, O.; Akerblom, H. K., Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* **2005**, 54 Suppl 2, S125-36.
65. Stankov, K.; Benc, D.; Draskovic, D., Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. *Pediatrics* **2013**, 132 (6), 1112-22.
66. Steck, A. K.; Rewers, M. J., Genetics of type 1 diabetes. *Clin Chem* **2011**, 57 (2), 176-85.
67. Sugihara, S., Genetic susceptibility of childhood type 1 diabetes mellitus in Japan. *Pediatr Endocrinol Rev* **2012**, 10 Suppl 1, 62-71.
68. Norris, J. M.; Barriga, K.; Klingensmith, G.; Hoffman, M.; Eisenbarth, G. S.; Erlich, H. A.; Rewers, M., Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* **2003**, 290 (13), 1713-20.
69. Bonifacio, E., Predicting type 1 diabetes using biomarkers. *Diabetes Care* **2015**, 38 (6), 989-96.
70. Insel, R. A.; Dunne, J. L.; Atkinson, M. A.; Chiang, J. L.; Dabelea, D.; Gottlieb, P. A.; Greenbaum, C. J.; Herold, K. C.; Krischer, J. P.; Lernmark, A.; Ratner, R. E.; Rewers, M. J.; Schatz, D. A.; Skyler, J. S.; Sosenko, J. M.; Ziegler, A. G., Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care* **2015**, 38 (10), 1964-74.

71. Sosenko, J. M.; Skyler, J. S.; Beam, C. A.; Krischer, J. P.; Greenbaum, C. J.; Mahon, J.; Rafkin, L. E.; Matheson, D.; Herold, K. C.; Palmer, J. P.; Type 1 Diabetes, T.; Diabetes Prevention Trial-Type 1 Study, G., Acceleration of the loss of the first-phase insulin response during the progression to type 1 diabetes in diabetes prevention trial-type 1 participants. *Diabetes* **2013**, *62* (12), 4179-83.
72. Greenbaum, C. J.; Beam, C. A.; Boulware, D.; Gitelman, S. E.; Gottlieb, P. A.; Herold, K. C.; Lachin, J. M.; McGee, P.; Palmer, J. P.; Pescovitz, M. D.; Krause-Steinrauf, H.; Skyler, J. S.; Sosenko, J. M.; Type 1 Diabetes TrialNet Study, G., Fall in C-peptide during first 2 years from diagnosis: evidence of at least two distinct phases from composite Type 1 Diabetes TrialNet data. *Diabetes* **2012**, *61* (8), 2066-73.
73. Oram, R. A.; Jones, A. G.; Besser, R. E.; Knight, B. A.; Shields, B. M.; Brown, R. J.; Hattersley, A. T.; McDonald, T. J., The majority of patients with long-duration type 1 diabetes are insulin microsecretors and have functioning beta cells. *Diabetologia* **2014**, *57* (1), 187-91.
74. Chatterjee, S.; Khunti, K.; Davies, M. J., Type 2 diabetes. *Lancet* **2017**, *389* (10085), 2239-2251.
75. Kautzky-Willer, A.; Harreiter, J.; Pacini, G., Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev* **2016**, *37* (3), 278-316.
76. Schwartz, S. S.; Epstein, S.; Corkey, B. E.; Grant, S. F.; Gavin, J. R., 3rd; Aguilar, R. B., The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationale and Implications of the beta-Cell-Centric Classification Schema. *Diabetes Care* **2016**, *39* (2), 179-86.
77. Taylor, R., Pathogenesis of type 2 diabetes: tracing the reverse route from cure to cause. *Diabetologia* **2008**, *51* (10), 1781-9.
78. Scheen, A. J., Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg* **2003**, *58* (6), 335-41.
79. van der Zijl, N. J.; Goossens, G. H.; Moors, C. C.; van Raalte, D. H.; Muskiet, M. H.; Pouwels, P. J.; Blaak, E. E.; Diamant, M., Ectopic fat storage in the pancreas, liver, and abdominal fat depots: impact on beta-cell function in individuals with impaired glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* **2011**, *96* (2), 459-67.
80. Halban, P. A.; Polonsky, K. S.; Bowden, D. W.; Hawkins, M. A.; Ling, C.; Mather, K. J.; Powers, A. C.; Rhodes, C. J.; Sussel, L.; Weir, G. C., beta-cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes Care* **2014**, *37* (6), 1751-8.
81. Ceriello, A.; Ihnat, M. A.; Thorpe, J. E., Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metab* **2009**, *94* (2), 410-5.
82. Bakker, W.; Eringa, E. C.; Sipkema, P.; van Hinsbergh, V. W., Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res* **2009**, *335* (1), 165-89.
83. Eizirik, D. L.; Pasquali, L.; Cnop, M., Pancreatic beta-cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol* **2020**, *16* (7), 349-362.
84. Bolivar, J. J., Essential hypertension: an approach to its etiology and neurogenic pathophysiology. *Int J Hypertens* **2013**, *2013*, 547809.

85. Black, H. R.; Glickman, M. G.; Schiff, M., Jr.; Pingoud, E. G., Renovascular hypertension: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Yale J Biol Med* **1978**, *51* (6), 635-54.
86. Staessen, J. A.; Wang, J.; Bianchi, G.; Birkenhager, W. H., Essential hypertension. *Lancet* **2003**, *361* (9369), 1629-41.
87. Russo, A.; Di Gaetano, C.; Cugliari, G.; Matullo, G., Advances in the Genetics of Hypertension: The Effect of Rare Variants. *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (3).
88. Saxena, T.; Ali, A. O.; Saxena, M., Pathophysiology of essential hypertension: an update. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **2018**, *16* (12), 879-887.
89. Takahashi, H.; Yoshika, M.; Komiyama, Y.; Nishimura, M., The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the renin-angiotensin-aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. *Hypertens Res* **2011**, *34* (11), 1147-60.
90. Wise, I. A.; Charchar, F. J., Epigenetic Modifications in Essential Hypertension. *Int J Mol Sci* **2016**, *17* (4), 451.
91. Messerli, F. H.; Ventura, H. O., Cardiovascular pathophysiology of essential hypertension: a clue to therapy. *Drugs* **1985**, *30 Suppl 1*, 25-34.
92. Guyton, A. C., Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science* **1991**, *252* (5014), 1813-6.
93. Harshfield, G. A.; Dong, Y.; Kapuku, G. K.; Zhu, H.; Hanevold, C. D., Stress-induced sodium retention and hypertension: a review and hypothesis. *Curr Hypertens Rep* **2009**, *11* (1), 29-34.
94. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ* **1988**, *297* (6644), 319-28.
95. DiBona, G. F.; Esler, M., Translational medicine: the antihypertensive effect of renal denervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2010**, *298* (2), R245-53.
96. Palm, F.; Nordquist, L., Renal oxidative stress, oxygenation, and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2011**, *301* (5), R1229-41.
97. Cain, A. E.; Khalil, R. A., Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, and the kidney. *Semin Nephrol* **2002**, *22* (1), 3-16.
98. Montecucco, F.; Pende, A.; Quercioli, A.; Mach, F., Inflammation in the pathophysiology of essential hypertension. *J Nephrol* **2011**, *24* (1), 23-34.
99. Rodrigo, R.; Passalacqua, W.; Araya, J.; Orellana, M.; Rivera, G., Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **2003**, *42* (4), 453-61.
100. Togliatto, G.; Lombardo, G.; Brizzi, M. F., The Future Challenge of Reactive Oxygen Species (ROS) in Hypertension: From Bench to Bed Side. *Int J Mol Sci* **2017**, *18* (9).
101. Lyon, C. J.; Law, R. E.; Hsueh, W. A., Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* **2003**, *144* (6), 2195-200.
102. Rodriguez-Iturbe, B.; Pons, H.; Quiroz, Y.; Johnson, R. J., The immunological basis of hypertension. *Am J Hypertens* **2014**, *27* (11), 1327-37.
103. Hall, J. E.; Mouton, A. J.; da Silva, A. A.; Omoto, A. C. M.; Wang, Z.; Li, X.; do Carmo, J. M., Obesity, kidney dysfunction, and inflammation: interactions in hypertension. *Cardiovasc Res* **2021**, *117* (8), 1859-1876.
104. Beevers, G.; Lip, G. Y.; O'Brien, E., ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ* **2001**, *322* (7291), 912-6.

105. Gau, G. T.; Wright, R. S., Pathophysiology, diagnosis, and management of dyslipidemia. *Curr Probl Cardiol* **2006**, *31* (7), 445-86.
106. Ballantyne, C. M.; Grundy, S. M.; Oberman, A.; Kreisberg, R. A.; Havel, R. J.; Frost, P. H.; Haffner, S. M., Hyperlipidemia: diagnostic and therapeutic perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, *85* (6), 2089-112.
107. Sato, R.; Takano, T., Regulation of intracellular cholesterol metabolism. *Cell Struct Funct* **1995**, *20* (6), 421-7.
108. Alves-Bezerra, M.; Cohen, D. E., Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol* **2017**, *8* (1), 1-8.
109. Hegele, R. A., Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet* **2009**, *10* (2), 109-21.
110. Garuti, R.; Jones, C.; Li, W. P.; Michaely, P.; Herz, J.; Gerard, R. D.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H., The modular adaptor protein autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) promotes low density lipoprotein receptor clustering into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* **2005**, *280* (49), 40996-1004.
111. Lagace, T. A., PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr Opin Lipidol* **2014**, *25* (5), 387-93.
112. Spolitu, S.; Dai, W.; Zadroga, J. A.; Ozcan, L., Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* **2019**, *30* (3), 186-191.
113. Marz, W.; Kleber, M. E.; Scharnagl, H.; Speer, T.; Zewinger, S.; Ritsch, A.; Parhofer, K. G.; von Eckardstein, A.; Landmesser, U.; Laufs, U., HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. *Clin Res Cardiol* **2017**, *106* (9), 663-675.
114. Gudbjartsson, D. F.; Thorgeirsson, G.; Sulem, P.; Helgadottir, A.; Gylfason, A.; Saemundsdottir, J.; Bjornsson, E.; Norddahl, G. L.; Jonasdottir, A.; Jonasdottir, A.; Eggertsson, H. P.; Gretarsdottir, S.; Thorleifsson, G.; Indridason, O. S.; Palsson, R.; Jonasson, F.; Jonsdottir, I.; Eyjolfsson, G. I.; Sigurdardottir, O.; Olafsson, I.; Danielsen, R.; Matthiasson, S. E.; Kristmundsdottir, S.; Halldorsson, B. V.; Hreidarsson, A. B.; Valdimarsson, E. M.; Gudnason, T.; Benediktsson, R.; Steinthorsdottir, V.; Thorsteinsdottir, U.; Holm, H.; Stefansson, K., Lipoprotein(a) Concentration and Risks of Cardiovascular Disease and Diabetes. *J Am Coll Cardiol* **2019**, *74* (24), 2982-2994.
115. Talmud, P. J.; Shah, S.; Whittall, R.; Futema, M.; Howard, P.; Cooper, J. A.; Harrison, S. C.; Li, K.; Drenos, F.; Karpe, F.; Neil, H. A.; Descamps, O. S.; Langenberg, C.; Lench, N.; Kivimaki, M.; Whittaker, J.; Hingorani, A. D.; Kumari, M.; Humphries, S. E., Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet* **2013**, *381* (9874), 1293-301.
116. Vodnala, D.; Rubenfire, M.; Brook, R. D., Secondary causes of dyslipidemia. *Am J Cardiol* **2012**, *110* (6), 823-5.
117. Berberich, A. J.; Hegele, R. A., The role of genetic testing in dyslipidaemia. *Pathology* **2019**, *51* (2), 184-192.
118. Krasi, G.; Bushati, V.; Precone, V.; Cortese, B.; Agostini, F.; Tezzele, S.; Baglivo, M.; Cecchin, S.; Aquilanti, B.; Velluti, V.; Matera, G.; Gagliardi, L.; Miggiano, G. A. D.; Bertelli, M., Monogenic hyperlipidemias. *Acta Biomed* **2019**, *90* (10-S), 47-49.
119. Ripatti, P.; Ramo, J. T.; Mars, N. J.; Fu, Y.; Lin, J.; Soderlund, S.; Benner, C.; Surakka, I.; Kiiskinen, T.; Havulinna, A. S.; Palta, P.; Freimer, N. B.; Widen, E.; Salomaa, V.; Tukiainen, T.; Pirinen, M.; Palotie, A.; Taskinen, M. R.; Ripatti, S.; FinnGenDagger,

Polygenic Hyperlipidemias and Coronary Artery Disease Risk. *Circ Genom Precis Med* **2020**, *13* (2), e002725.

120. Fredrickson, D. S., An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Ann Intern Med* **1971**, *75* (3), 471-2.

121. Fredrickson, D. S.; Lees, R. S., A System for Phenotyping Hyperlipoproteinemia. *Circulation* **1965**, *31*, 321-7.

122. Berberich, A. J.; Hegele, R. A., A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr Rev* **2022**, *43* (4), 611-653.

123. Ford, I.; Murray, H.; McCowan, C.; Packard, C. J., Long-Term Safety and Efficacy of Lowering Low-Density Lipoprotein Cholesterol With Statin Therapy: 20-Year Follow-Up of West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* **2016**, *133* (11), 1073-80.

124. Wolska, A.; Yang, Z. H.; Remaley, A. T., Hypertriglyceridemia: new approaches in management and treatment. *Curr Opin Lipidol* **2020**, *31* (6), 331-339.

125. Mora, S.; Otvos, J. D.; Rifai, N.; Rosenson, R. S.; Buring, J. E.; Ridker, P. M., Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation* **2009**, *119* (7), 931-9.

126. Raskob, G. E.; Angchaisuksiri, P.; Blanco, A. N.; Buller, H.; Gallus, A.; Hunt, B. J.; Hylek, E. M.; Kakkar, A.; Konstantinides, S. V.; McCumber, M.; Ozaki, Y.; Wendelboe, A.; Weitz, J. I.; Day, I. S. C. f. W. T., Thrombosis: a major contributor to global disease burden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2014**, *34* (11), 2363-71.

127. Shah, I. K.; Merfeld, J. M.; Chun, J.; Tak, T., Pathophysiology and Management of Pulmonary Embolism. *Int J Angiol* **2022**, *31* (3), 143-149.

128. Huet, Y.; Lemaire, F.; Brun-Buisson, C.; Knaus, W. A.; Teisseire, B.; Payen, D.; Mathieu, D., Hypoxemia in acute pulmonary embolism. *Chest* **1985**, *88* (6), 829-36.

129. D'Alonzo, G. E.; Bower, J. S.; DeHart, P.; Dantzker, D. R., The mechanisms of abnormal gas exchange in acute massive pulmonary embolism. *Am Rev Respir Dis* **1983**, *128* (1), 170-2.

130. Konstantinides, S.; Geibel, A.; Kasper, W.; Olschewski, M.; Blumel, L.; Just, H., Patent foramen ovale is an important predictor of adverse outcome in patients with major pulmonary embolism. *Circulation* **1998**, *97* (19), 1946-51.

131. Gurewich, V.; Thomas, D.; Stein, M.; Wessler, S., Bronchoconstriction in the presence of pulmonary embolism. *Circulation* **1963**, *27*, 339-45.

132. Smulders, Y. M., Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **2000**, *48* (1), 23-33.

133. Tsang, J. Y.; Lamm, W. J., Estimation of endothelin-mediated vasoconstriction in acute pulmonary thromboembolism. *Pulm Circ* **2012**, *2* (1), 67-74.

134. van Wolferen, S. A.; Marcus, J. T.; Westerhof, N.; Spreeuwenberg, M. D.; Marques, K. M.; Bronzwaer, J. G.; Henkens, I. R.; Gan, C. T.; Boonstra, A.; Postmus, P. E.; Vonk-Noordegraaf, A., Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *Eur Heart J* **2008**, *29* (1), 120-7.

135. Lualdi, J. C.; Goldhaber, S. Z., Right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism: pathophysiologic factors, detection, and therapeutic implications. *Am Heart J* **1995**, *130* (6), 1276-82.

136. Humbert, M.; Kovacs, G.; Hoeper, M. M.; Badagliacca, R.; Berger, R. M. F.; Brida, M.; Carlsen, J.; Coats, A. J. S.; Escribano-Subias, P.; Ferrari, P.; Ferreira, D. S.; Ghofrani,

- H. A.; Giannakoulas, G.; Kiely, D. G.; Mayer, E.; Meszaros, G.; Nagavci, B.; Olsson, K. M.; Pepke-Zaba, J.; Quint, J. K.; Radegran, G.; Simonneau, G.; Sitbon, O.; Tonia, T.; Toshner, M.; Vachieri, J. L.; Vonk Noordegraaf, A.; Delcroix, M.; Rosenkranz, S.; Group, E. E. S. D., 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* **2022**, *43* (38), 3618-3731.
137. Loyd, J. E.; Butler, M. G.; Foroud, T. M.; Conneally, P. M.; Phillips, J. A., 3rd; Newman, J. H., Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **1995**, *152* (1), 93-7.
138. Fukumoto, Y., Pathophysiology and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* **2024**, *25* (2).
139. Louie, E. K.; Rich, S.; Brundage, B. H., Doppler echocardiographic assessment of impaired left ventricular filling in patients with right ventricular pressure overload due to primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **1986**, *8* (6), 1298-306.
140. Fukuda, K.; Date, H.; Doi, S.; Fukumoto, Y.; Fukushima, N.; Hatano, M.; Ito, H.; Kuwana, M.; Matsubara, H.; Momomura, S. I.; Nishimura, M.; Ogino, H.; Satoh, T.; Shimokawa, H.; Yamauchi-Takahara, K.; Tatsumi, K.; Ishibashi-Ueda, H.; Yamada, N.; Yoshida, S.; Abe, K.; Ogawa, A.; Ogo, T.; Kasai, T.; Kataoka, M.; Kawakami, T.; Kogaki, S.; Nakamura, M.; Nakayama, T.; Nishizaki, M.; Sugimura, K.; Tanabe, N.; Tsujino, I.; Yao, A.; Akasaka, T.; Ando, M.; Kimura, T.; Kuriyama, T.; Nakanishi, N.; Nakanishi, T.; Tsutsui, H.; Japanese Circulation, S.; the Japanese Pulmonary, C.; Pulmonary Hypertension Society Joint Working, G., Guidelines for the Treatment of Pulmonary Hypertension (JCS 2017/JPCPHS 2017). *Circ J* **2019**, *83* (4), 842-945.
141. Heath, D.; Smith, P.; Gosney, J.; Mulcahy, D.; Fox, K.; Yacoub, M.; Harris, P., The pathology of the early and late stages of primary pulmonary hypertension. *Br Heart J* **1987**, *58* (3), 204-13.
142. Cool, C. D.; Stewart, J. S.; Werahera, P.; Miller, G. J.; Williams, R. L.; Voelkel, N. F.; Tuder, R. M., Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol* **1999**, *155* (2), 411-9.
143. Frank, H.; Mlczech, J.; Huber, K.; Schuster, E.; Gurtner, H. P.; Kneussl, M., The effect of anticoagulant therapy in primary and anorectic drug-induced pulmonary hypertension. *Chest* **1997**, *112* (3), 714-21.
144. Frisch, H. F.; Marshall, C.; Marshall, B. E., Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* **1999**, *276* (2), L304-10.
145. Battegay, E. J.; Raines, E. W.; Seifert, R. A.; Bowen-Pope, D. F.; Ross, R., TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* **1990**, *63* (3), 515-24.
146. Aluru, J. S.; Barsouk, A.; Saginala, K.; Rawla, P.; Barsouk, A., Valvular Heart Disease Epidemiology. *Med Sci (Basel)* **2022**, *10* (2).
147. Nightingale, A. K.; Horowitz, J. D., Aortic sclerosis: not an innocent murmur but a marker of increased cardiovascular risk. *Heart* **2005**, *91* (11), 1389-93.
148. Lindman, B. R.; Clavel, M. A.; Mathieu, P.; Jung, B.; Lancellotti, P.; Otto, C. M.; Pibarot, P., Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* **2016**, *2*, 16006.
149. Yutzev, K. E.; Demer, L. L.; Body, S. C.; Huggins, G. S.; Towler, D. A.; Giachelli, C. M.; Hofmann-Bowman, M. A.; Mortlock, D. P.; Rogers, M. B.; Sadeghi, M. M.; Aikawa, E.,

Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2014**, *34* (11), 2387-93.

150. Mahmut, A.; Boulanger, M. C.; El Hussein, D.; Fournier, D.; Bouchareb, R.; Despres, J. P.; Pibarot, P.; Bosse, Y.; Mathieu, P., Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization. *J Am Coll Cardiol* **2014**, *63* (5), 460-9.

151. West, X. Z.; Malinin, N. L.; Merkulova, A. A.; Tischenko, M.; Kerr, B. A.; Borden, E. C.; Podrez, E. A.; Salomon, R. G.; Byzova, T. V., Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature* **2010**, *467* (7318), 972-6.

152. Proudfoot, D.; Skepper, J. N.; Hegyi, L.; Bennett, M. R.; Shanahan, C. M.; Weissberg, P. L., Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* **2000**, *87* (11), 1055-62.

153. Goettsch, C.; Hutcheson, J. D.; Aikawa, E., MicroRNA in cardiovascular calcification: focus on targets and extracellular vesicle delivery mechanisms. *Circ Res* **2013**, *112* (7), 1073-84.

154. Chambers, J., The left ventricle in aortic stenosis: evidence for the use of ACE inhibitors. *Heart* **2006**, *92* (3), 420-3.

155. Staerk, L.; Sherer, J. A.; Ko, D.; Benjamin, E. J.; Helm, R. H., Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes. *Circ Res* **2017**, *120* (9), 1501-1517.

156. McAllen, P. M.; Marshall, J., Cardiac dysrhythmia and transient cerebral ischaemic attacks. *Lancet* **1973**, *1* (7814), 1212-4.

157. Hara, M.; Ooie, T.; Yufu, K.; Tsunematsu, Y.; Kusakabe, T.; Ooga, M.; Saikawa, T.; Sakata, T., Silent cortical strokes associated with atrial fibrillation. *Clin Cardiol* **1995**, *18* (10), 573-4.

158. Bekwelem, W.; Connolly, S. J.; Halperin, J. L.; Adabag, S.; Duval, S.; Chrolavicius, S.; Pogue, J.; Ezekowitz, M. D.; Eikelboom, J. W.; Wallentin, L. G.; Yusuf, S.; Hirsch, A. T., Extracranial Systemic Embolic Events in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation: Incidence, Risk Factors, and Outcomes. *Circulation* **2015**, *132* (9), 796-803.

159. Wang, T. J.; Larson, M. G.; Levy, D.; Vasan, R. S.; Leip, E. P.; Wolf, P. A.; D'Agostino, R. B.; Murabito, J. M.; Kannel, W. B.; Benjamin, E. J., Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study. *Circulation* **2003**, *107* (23), 2920-5.

160. Goette, A.; Kalman, J. M.; Aguinaga, L.; Akar, J.; Cabrera, J. A.; Chen, S. A.; Chugh, S. S.; Corradi, D.; D'Avila, A.; Dobrev, D.; Fenelon, G.; Gonzalez, M.; Hatem, S. N.; Helm, R.; Hindricks, G.; Ho, S. Y.; Hoit, B.; Jalife, J.; Kim, Y. H.; Lip, G. Y.; Ma, C. S.; Marcus, G. M.; Murray, K.; Nogami, A.; Sanders, P.; Uribe, W.; Van Wagoner, D. R.; Nattel, S.; Document, R., EHRA/HRS/APHRS/SOLAECE expert consensus on atrial cardiomyopathies: definition, characterization, and clinical implication. *Europace* **2016**, *18* (10), 1455-1490.

161. Haissaguerre, M.; Jais, P.; Shah, D. C.; Takahashi, A.; Hocini, M.; Quiniou, G.; Garrigue, S.; Le Mouroux, A.; Le Metayer, P.; Clementy, J., Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* **1998**, *339* (10), 659-66.

162. Schuessler, R. B.; Grayson, T. M.; Bromberg, B. I.; Cox, J. L.; Boineau, J. P., Cholinergically mediated tachyarrhythmias induced by a single extrastimulus in the isolated canine right atrium. *Circ Res* **1992**, *71* (5), 1254-67.

163. Lau, D. H.; Mackenzie, L.; Kelly, D. J.; Psaltis, P. J.; Worthington, M.; Rajendram, A.; Kelly, D. R.; Nelson, A. J.; Zhang, Y.; Kuklik, P.; Brooks, A. G.; Worthley, S. G.; Faull,

- R. J.; Rao, M.; Edwards, J.; Saint, D. A.; Sanders, P., Short-term hypertension is associated with the development of atrial fibrillation substrate: a study in an ovine hypertensive model. *Heart Rhythm* **2010**, *7* (3), 396-404.
164. Dobrev, D.; Heijman, J.; Hiram, R.; Li, N.; Nattel, S., Inflammatory signalling in atrial cardiomyocytes: a novel unifying principle in atrial fibrillation pathophysiology. *Nat Rev Cardiol* **2023**, *20* (3), 145-167.
165. Rafaqat, S.; Sharif, S.; Majeed, M.; Naz, S.; Manzoor, F.; Rafaqat, S., Biomarkers of Metabolic Syndrome: Role in Pathogenesis and Pathophysiology Of Atrial Fibrillation. *J Atr Fibrillation* **2021**, *14* (2), 20200495.
166. Veasey, R. A.; Sugihara, C.; Sandhu, K.; Dhillon, G.; Freemantle, N.; Furniss, S. S.; Sulke, A. N., The natural history of atrial fibrillation in patients with permanent pacemakers: is atrial fibrillation a progressive disease? *J Interv Card Electrophysiol* **2015**, *44* (1), 23-30.
167. Schnabel, R. B.; Yin, X.; Gona, P.; Larson, M. G.; Beiser, A. S.; McManus, D. D.; Newton-Cheh, C.; Lubitz, S. A.; Magnani, J. W.; Ellinor, P. T.; Seshadri, S.; Wolf, P. A.; Vasan, R. S.; Benjamin, E. J.; Levy, D., 50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet* **2015**, *386* (9989), 154-62.
168. Vinciguerra, M.; Dobrev, D.; Nattel, S., Atrial fibrillation: pathophysiology, genetic and epigenetic mechanisms. *Lancet Reg Health Eur* **2024**, *37*, 100785.
169. Liang, Z.; He, Y.; Hu, X., Cardio-Oncology: Mechanisms, Drug Combinations, and Reverse Cardio-Oncology. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (18).
170. Okwuosa, T. M.; Anzevino, S.; Rao, R., Cardiovascular disease in cancer survivors. *Postgrad Med J* **2017**, *93* (1096), 82-90.
171. Dent, S.; Liu, P.; Brezden-Masley, C.; Lenihan, D., Cancer and Cardiovascular Disease: The Complex Labyrinth. *J Oncol* **2015**, *2015*, 516450.
172. Madeddu, C.; Deidda, M.; Piras, A.; Cadeddu, C.; Demurtas, L.; Puzzone, M.; Piscopo, G.; Scartozzi, M.; Mercuro, G., Pathophysiology of cardiotoxicity induced by nonanthracycline chemotherapy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **2016**, *17* Suppl 1, S12-8.
173. Spetz, J.; Moslehi, J.; Sarosiek, K., Radiation-Induced Cardiovascular Toxicity: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* **2018**, *20* (4), 31.
174. Zamorano, J. L.; Lancellotti, P.; Rodriguez Munoz, D.; Aboyans, V.; Asteggiano, R.; Galderisi, M.; Habib, G.; Lenihan, D. J.; Lip, G. Y. H.; Lyon, A. R.; Lopez Fernandez, T.; Mohty, D.; Piepoli, M. F.; Tamargo, J.; Torbicki, A.; Suter, T. M.; Group, E. S. C. S. D., 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* **2016**, *37* (36), 2768-2801.
175. Sawyer, D. B.; Peng, X.; Chen, B.; Pentassuglia, L.; Lim, C. C., Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? *Prog Cardiovasc Dis* **2010**, *53* (2), 105-13.
176. Suter, T. M.; Ewer, M. S., Cancer drugs and the heart: importance and management. *Eur Heart J* **2013**, *34* (15), 1102-11.
177. Eschenhagen, T.; Force, T.; Ewer, M. S.; de Keulenaer, G. W.; Suter, T. M.; Anker, S. D.; Avkiran, M.; de Azambuja, E.; Balligand, J. L.; Brutsaert, D. L.; Condorelli, G.; Hansen, A.; Heymans, S.; Hill, J. A.; Hirsch, E.; Hilfiker-Kleiner, D.; Janssens, S.; de Jong,

- S.; Neubauer, G.; Pieske, B.; Ponikowski, P.; Pirmohamed, M.; Rauchhaus, M.; Sawyer, D.; Sugden, P. H.; Wojta, J.; Zannad, F.; Shah, A. M., Cardiovascular side effects of cancer therapies: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* **2011**, *13* (1), 1-10.
178. Bergiers, S.; Vaes, B.; Degryse, J., To screen or not to screen for peripheral arterial disease in subjects aged 80 and over in primary health care: a cross-sectional analysis from the BELFRAIL study. *BMC Fam Pract* **2011**, *12*, 39.
179. Subherwal, S.; Patel, M. R.; Kober, L.; Peterson, E. D.; Bhatt, D. L.; Gislason, G. H.; Olsen, A. M.; Jones, W. S.; Torp-Pedersen, C.; Fosbol, E. L., Peripheral artery disease is a coronary heart disease risk equivalent among both men and women: results from a nationwide study. *Eur J Prev Cardiol* **2015**, *22* (3), 317-25.
180. Meijer, W. T.; Grobbee, D. E.; Hunink, M. G.; Hofman, A.; Hoes, A. W., Determinants of peripheral arterial disease in the elderly: the Rotterdam study. *Arch Intern Med* **2000**, *160* (19), 2934-8.
181. Simon, F.; Oberhuber, A.; Floros, N.; Duppers, P.; Schelzig, H.; Duran, M., Pathophysiology of chronic limb ischemia. *Gefasschirurgie* **2018**, *23* (Suppl 1), 13-18.
182. Signorelli, S. S.; Marino, E.; Scuto, S.; Di Raimondo, D., Pathophysiology of Peripheral Arterial Disease (PAD): A Review on Oxidative Disorders. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (12).
183. Krishna, S. M.; Moxon, J. V.; Golledge, J., A review of the pathophysiology and potential biomarkers for peripheral artery disease. *Int J Mol Sci* **2015**, *16* (5), 11294-322.
184. Kim, H. O.; Kim, W., Elucidation of the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Disease. *Korean Circ J* **2018**, *48* (9), 826-827.
185. McDermott, M. M.; Greenland, P.; Liu, K.; Guralnik, J. M.; Criqui, M. H.; Dolan, N. C.; Chan, C.; Celic, L.; Pearce, W. H.; Schneider, J. R.; Sharma, L.; Clark, E.; Gibson, D.; Martin, G. J., Leg symptoms in peripheral arterial disease: associated clinical characteristics and functional impairment. *JAMA* **2001**, *286* (13), 1599-606.
186. Pipinos, I.; Sharov, V. G.; Shepard, A. D.; Anagnostopoulos, P. V.; Katsamouris, A.; Todor, A.; Filis, K. A.; Sabbah, H. N., Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* **2003**, *38* (4), 827-32.
187. Behera, S. S.; Pramanik, K.; Nayak, M. K., Recent Advancement in the Treatment of Cardiovascular Diseases: Conventional Therapy to Nanotechnology. *Curr Pharm Des* **2015**, *21* (30), 4479-97.
188. Panju, A. A.; Hemmelgarn, B. R.; Guyatt, G. H.; Simel, D. L., The rational clinical examination. Is this patient having a myocardial infarction? *JAMA* **1998**, *280* (14), 1256-63.
189. Dhama, K.; Latheef, S. K.; Dadar, M.; Samad, H. A.; Munjal, A.; Khandia, R.; Karthik, K.; Tiwari, R.; Yatoo, M. I.; Bhatt, P.; Chakraborty, S.; Singh, K. P.; Iqbal, H. M. N.; Chaicumpa, W.; Joshi, S. K., Biomarkers in Stress Related Diseases/Disorders: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Values. *Front Mol Biosci* **2019**, *6*, 91.
190. Bodaghi, A.; Fattahi, N.; Ramazani, A., Biomarkers: Promising and valuable tools towards diagnosis, prognosis and treatment of Covid-19 and other diseases. *Heliyon* **2023**, *9* (2), e13323.
191. Wishart, D. S.; Bartok, B.; Oler, E.; Liang, K. Y. H.; Budinski, Z.; Berjanskii, M.; Guo, A.; Cao, X.; Wilson, M., MarkerDB: an online database of molecular biomarkers. *Nucleic Acids Res* **2021**, *49* (D1), D1259-D1267.

192. Garner, R.; La Rocca, M.; Vespa, P.; Jones, N.; Monti, M. M.; Toga, A. W.; Duncan, D., Imaging biomarkers of posttraumatic epileptogenesis. *Epilepsia* **2019**, *60* (11), 2151-2162.
193. Erickson, B. J.; Bartholmai, B., Computer-aided detection and diagnosis at the start of the third millennium. *J Digit Imaging* **2002**, *15* (2), 59-68.
194. Silajdzic, E.; Bjorkqvist, M., A Critical Evaluation of Wet Biomarkers for Huntington's Disease: Current Status and Ways Forward. *J Huntingtons Dis* **2018**, *7* (2), 109-135.
195. Mamidi, T. K. K.; Wu, J.; Hicks, C., Mapping the Germline and Somatic Mutation Interaction Landscape in Indolent and Aggressive Prostate Cancers. *J Oncol* **2019**, *2019*, 4168784.
196. Umelo, I. A.; Costanza, B.; Castronovo, V., Innovative methods for biomarker discovery in the evaluation and development of cancer precision therapies. *Cancer Metastasis Rev* **2018**, *37* (1), 125-145.
197. Pandey, A.; Mann, M., Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **2000**, *405* (6788), 837-46.
198. Ballereau, S.; Glaab, E.; Kolodkin, A.; Chaiboonchoe, A.; Biryukov, M.; Vlassis, N.; Ahmed, H.; Pellet, J.; Baliga, N.; Hood, L.; Schneider, R.; Balling, R.; Auffray, C., Functional Genomics, Proteomics, Metabolomics and Bioinformatics for Systems Biology. In *Systems Biology*, 2013; pp 3-41.
199. Califf, R. M., Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood)* **2018**, *243* (3), 213-221.
200. Aronson, J. K.; Ferner, R. E., Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol* **2017**, *76*, 9 23 1-9 23 17.
201. Smith, J. J.; Sorensen, A. G.; Thrall, J. H., Biomarkers in imaging: realizing radiology's future. *Radiology* **2003**, *227* (3), 633-8.
202. Lanza, G. M.; Winter, P. M.; Caruthers, S. D.; Morawski, A. M.; Schmieder, A. H.; Crowder, K. C.; Wickline, S. A., Magnetic resonance molecular imaging with nanoparticles. *J Nucl Cardiol* **2004**, *11* (6), 733-43.
203. Chen, J.; Tung, C. H.; Mahmood, U.; Ntziachristos, V.; Gyurko, R.; Fishman, M. C.; Huang, P. L.; Weissleder, R., In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* **2002**, *105* (23), 2766-71.
204. Vasan, R. S., Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* **2006**, *113* (19), 2335-62.
205. Strimbu, K.; Tavel, J. A., What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* **2010**, *5* (6), 463-6.
206. Wilsgaard, T.; Mathiesen, E. B.; Patwardhan, A.; Rowe, M. W.; Schirmer, H.; Lochen, M. L.; Sudduth-Klinger, J.; Hamren, S.; Bonaa, K. H.; Njolstad, I., Clinically significant novel biomarkers for prediction of first ever myocardial infarction: the Tromso Study. *Circ Cardiovasc Genet* **2015**, *8* (2), 363-71.
207. Robb, M. A.; McInnes, P. M.; Califf, R. M., Biomarkers and Surrogate Endpoints: Developing Common Terminology and Definitions. *JAMA* **2016**, *315* (11), 1107-8.
208. Zerhouni, E., Medicine. The NIH Roadmap. *Science* **2003**, *302* (5642), 63-72.
209. Antoniou, M.; Kolamunnage-Dona, R.; Wason, J.; Bathia, R.; Billingham, C.; Bliss, J. M.; Brown, L. C.; Gillman, A.; Paul, J.; Jorgensen, A. L., Biomarker-guided trials: Challenges in practice. *Contemp Clin Trials Commun* **2019**, *16*, 100493.
210. Biomarkers Definitions Working, G., Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **2001**, *69* (3), 89-95.

211. Deeks, J. J.; Altman, D. G., Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ* **2004**, 329 (7458), 168-9.
212. Hlatky, M. A.; Greenland, P.; Arnett, D. K.; Ballantyne, C. M.; Criqui, M. H.; Elkind, M. S.; Go, A. S.; Harrell, F. E., Jr.; Hong, Y.; Howard, B. V.; Howard, V. J.; Hsue, P. Y.; Kramer, C. M.; McConnell, J. P.; Normand, S. L.; O'Donnell, C. J.; Smith, S. C., Jr.; Wilson, P. W.; American Heart Association Expert Panel on Subclinical Atherosclerotic, D.; Emerging Risk, F.; the Stroke, C., Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **2009**, 119 (17), 2408-16.
213. Dhingra, R.; Vasan, R. S., Biomarkers in cardiovascular disease: Statistical assessment and section on key novel heart failure biomarkers. *Trends Cardiovasc Med* **2017**, 27 (2), 123-133.
214. Solberg, H. E., International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* **1987**, 25 (5), 337-42.
215. Lott, J. A.; Mitchell, L. C.; Moeschberger, M. L.; Sutherland, D. E., Estimation of reference ranges: how many subjects are needed? *Clin Chem* **1992**, 38 (5), 648-50.
216. Fortmann, S. P.; Ford, E.; Criqui, M. H.; Folsom, A. R.; Harris, T. B.; Hong, Y.; Pearson, T. A.; Siscovick, D.; Vinicor, F.; Wilson, P. F.; Cdc; Aha, CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the population science discussion group. *Circulation* **2004**, 110 (25), e554-9.
217. Alpert, J. S.; Thygesen, K.; Antman, E.; Bassand, J. P., Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **2000**, 36 (3), 959-69.
218. Hanley, J. A.; McNeil, B. J., The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* **1982**, 143 (1), 29-36.
219. Prentice, R. L.; Zhao, S., Regression Models and Multivariate Life Tables. *J Am Stat Assoc* **2021**, 116 (535), 1330-1345.
220. Cook, N. R., Use and misuse of the receiver operating characteristic curve in risk prediction. *Circulation* **2007**, 115 (7), 928-35.
221. Justice, A. C.; Covinsky, K. E.; Berlin, J. A., Assessing the generalizability of prognostic information. *Ann Intern Med* **1999**, 130 (6), 515-24.
222. Shaughnessy, A. F., Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine. *Bmj* **2007**, 335 (7623), 777.2-777.
223. Fagan, T. J., Letter: Nomogram for Bayes's theorem. *N Engl J Med* **1975**, 293 (5), 257.
224. Antman, E. M.; Sabatine, M. S.; de Lemos, J. A.; Morrow, D. A., The Search for a Biomarker of Cardiac Ischemia. *Clinical Chemistry* **2003**, 49 (4), 537-539.
225. Hlatky, M. A., Exercise testing to predict outcome in patients with angina. *Journal of General Internal Medicine* **1999**, 14 (1), 63-65.
226. Adamcova, M.; Simko, F., Multiplex biomarker approach to cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin* **2018**, 39 (7), 1068-1072.

227. Ware, J. H., The limitations of risk factors as prognostic tools. *N Engl J Med* **2006**, 355 (25), 2615-7.
228. Johnson, J. A.; Cavallari, L. H., Pharmacogenetics and cardiovascular disease--implications for personalized medicine. *Pharmacol Rev* **2013**, 65 (3), 987-1009.
229. Wang, T. J.; Gona, P.; Larson, M. G.; Tofler, G. H.; Levy, D.; Newton-Cheh, C.; Jacques, P. F.; Rifai, N.; Selhub, J.; Robins, S. J.; Benjamin, E. J.; D'Agostino, R. B.; Vasan, R. S., Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med* **2006**, 355 (25), 2631-9.
230. Greenland, P.; O'Malley, P. G., When is a new prediction marker useful? A consideration of lipoprotein-associated phospholipase A2 and C-reactive protein for stroke risk. *Arch Intern Med* **2005**, 165 (21), 2454-6.
231. Hackam, D. G.; Anand, S. S., Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA* **2003**, 290 (7), 932-40.
232. Petersen, P. H.; Ricos, C.; Stockl, D.; Libeer, J. C.; Baadenhuijsen, H.; Fraser, C.; Thienpont, L., Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **1996**, 34 (12), 983-99.
233. Buttner, J., Reference materials and reference methods in laboratory medicine: a challenge to international cooperation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **1994**, 32 (8), 571-7.
234. McHugh, M. L., Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb)* **2012**, 22 (3), 276-82.
235. Gardin, J. M., How reliable are serial echocardiographic measurements in detecting regression in left ventricular hypertrophy and changes in function? *J Am Coll Cardiol* **1999**, 34 (5), 1633-6.
236. Pompanon, F.; Bonin, A.; Bellemain, E.; Taberlet, P., Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* **2005**, 6 (11), 847-59.
237. Price, C. P., Point of care testing. *BMJ* **2001**, 322 (7297), 1285-8.
238. Shah, R. U.; Rumsfeld, J. S., Big Data in Cardiology. *Eur Heart J* **2017**, 38 (24), 1865-1867.
239. Rumsfeld, J. S.; Joynt, K. E.; Maddox, T. M., Big data analytics to improve cardiovascular care: promise and challenges. *Nat Rev Cardiol* **2016**, 13 (6), 350-9.
240. Insel, T. R., Digital Phenotyping: Technology for a New Science of Behavior. *JAMA* **2017**, 318 (13), 1215-1216.
241. International HapMap, C., A haplotype map of the human genome. *Nature* **2005**, 437 (7063), 1299-320.
242. Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; Funke, R.; Gage, D.; Harris, K.; Heaford, A.; Howland, J.; Kann, L.; Lehoczky, J.; LeVine, R.; McEwan, P.; McKernan, K.; Meldrim, J.; Mesirov, J. P.; Miranda, C.; Morris, W.; Naylor, J.; Raymond, C.; Rosetti, M.; Santos, R.; Sheridan, A.; Sougnez, C.; Stange-Thomann, Y.; Stojanovic, N.; Subramanian, A.; Wyman, D.; Rogers, J.; Sulston, J.; Ainscough, R.; Beck, S.; Bentley, D.; Burton, J.; Clee, C.; Carter, N.; Coulson, A.; Deadman, R.; Deloukas, P.; Dunham, A.; Dunham, I.; Durbin, R.; French, L.; Grafham, D.; Gregory, S.; Hubbard, T.; Humphray, S.; Hunt, A.; Jones, M.; Lloyd, C.; McMurray, A.; Matthews, L.; Mercer, S.; Milne, S.; Mullikin, J. C.; Mungall, A.; Plumb, R.; Ross, M.; Shownkeen, R.; Sims, S.; Waterston, R. H.; Wilson, R. K.; Hillier, L. W.; McPherson, J. D.; Marra, M. A.; Mardis, E. R.; Fulton, L. A.; Chinwalla, A. T.; Pepin, K. H.; Gish, W. R.; Chissoe, S. L.; Wendl, M. C.; Delehaunty, K. D.; Miner, T. L.; Delehaunty, A.; Kramer, J. B.; Cook, L. L.; Fulton, R. S.; Johnson, D. L.; Minx, P. J.; Clifton, S. W.;

Hawkins, T.; Branscomb, E.; Predki, P.; Richardson, P.; Wenning, S.; Slezak, T.; Doggett, N.; Cheng, J. F.; Olsen, A.; Lucas, S.; Elkin, C.; Uberbacher, E.; Frazier, M.; Gibbs, R. A.; Muzny, D. M.; Scherer, S. E.; Bouck, J. B.; Sodergren, E. J.; Worley, K. C.; Rives, C. M.; Gorrell, J. H.; Metzker, M. L.; Naylor, S. L.; Kucherlapati, R. S.; Nelson, D. L.; Weinstock, G. M.; Sakaki, Y.; Fujiyama, A.; Hattori, M.; Yada, T.; Toyoda, A.; Itoh, T.; Kawagoe, C.; Watanabe, H.; Totoki, Y.; Taylor, T.; Weissenbach, J.; Heilig, R.; Saurin, W.; Artiguenave, F.; Brottier, P.; Bruls, T.; Pelletier, E.; Robert, C.; Wincker, P.; Smith, D. R.; Doucette-Stamm, L.; Rubenfield, M.; Weinstock, K.; Lee, H. M.; Dubois, J.; Rosenthal, A.; Platzer, M.; Nyakatura, G.; Taudien, S.; Rump, A.; Yang, H.; Yu, J.; Wang, J.; Huang, G.; Gu, J.; Hood, L.; Rowen, L.; Madan, A.; Qin, S.; Davis, R. W.; Federspiel, N. A.; Abola, A. P.; Proctor, M. J.; Myers, R. M.; Schmutz, J.; Dickson, M.; Grimwood, J.; Cox, D. R.; Olson, M. V.; Kaul, R.; Raymond, C.; Shimizu, N.; Kawasaki, K.; Minoshima, S.; Evans, G. A.; Athanasiou, M.; Schultz, R.; Roe, B. A.; Chen, F.; Pan, H.; Ramser, J.; Lehrach, H.; Reinhardt, R.; McCombie, W. R.; de la Bastide, M.; Dedhia, N.; Blocker, H.; Hornischer, K.; Nordsiek, G.; Agarwala, R.; Aravind, L.; Bailey, J. A.; Bateman, A.; Batzoglu, S.; Birney, E.; Bork, P.; Brown, D. G.; Burge, C. B.; Cerutti, L.; Chen, H. C.; Church, D.; Clamp, M.; Copley, R. R.; Doerks, T.; Eddy, S. R.; Eichler, E. E.; Furey, T. S.; Galagan, J.; Gilbert, J. G.; Harmon, C.; Hayashizaki, Y.; Haussler, D.; Hermjakob, H.; Hokamp, K.; Jang, W.; Johnson, L. S.; Jones, T. A.; Kasif, S.; Kasprzyk, A.; Kennedy, S.; Kent, W. J.; Kitts, P.; Koonin, E. V.; Korf, I.; Kulp, D.; Lancet, D.; Lowe, T. M.; McLysaght, A.; Mikkelsen, T.; Moran, J. V.; Mulder, N.; Pollara, V. J.; Ponting, C. P.; Schuler, G.; Schultz, J.; Slater, G.; Smit, A. F.; Stupka, E.; Szustakowki, J.; Thierry-Mieg, D.; Thierry-Mieg, J.; Wagner, L.; Wallis, J.; Wheeler, R.; Williams, A.; Wolf, Y. I.; Wolfe, K. H.; Yang, S. P.; Yeh, R. F.; Collins, F.; Guyer, M. S.; Peterson, J.; Felsenfeld, A.; Wetterstrand, K. A.; Patrinos, A.; Morgan, M. J.; de Jong, P.; Catanese, J. J.; Osoegawa, K.; Shizuya, H.; Choi, S.; Chen, Y. J.; Szustakowki, J.; International Human Genome Sequencing, C., Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409* (6822), 860-921.

243. Hackett, J. L.; Gutman, S. I., Introduction to the Food and Drug Administration (FDA) regulatory process. *J Proteome Res* **2005**, *4* (4), 1110-3.

244. Hook, C. C.; DiMagno, E. P.; Tefferi, A., Primer on medical genomics. Part XIII: Ethical and regulatory issues. *Mayo Clin Proc* **2004**, *79* (5), 645-50.

245. Palmer, L. J.; Cardon, L. R., Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *Lancet* **2005**, *366* (9492), 1223-34.

246. Morrow, D. A.; Braunwald, E., Future of biomarkers in acute coronary syndromes: moving toward a multimarker strategy. *Circulation* **2003**, *108* (3), 250-2.

247. Weston, A. D.; Hood, L., Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J Proteome Res* **2004**, *3* (2), 179-96.

248. Zhao, C.; Guo, L.; Dong, J.; Cai, Z., Mass spectrometry imaging-based multi-modal technique: Next-generation of biochemical analysis strategy. *Innovation (Camb)* **2021**, *2* (4), 100151.

249. Forman, D. E.; de Lemos, J. A.; Shaw, L. J.; Reuben, D. B.; Lyubarova, R.; Peterson, E. D.; Spertus, J. A.; Zieman, S.; Salive, M. E.; Rich, M. W.; Geriatric Cardiology Section Leadership, C., Cardiovascular Biomarkers and Imaging in Older Adults: JACC Council Perspectives. *J Am Coll Cardiol* **2020**, *76* (13), 1577-1594.

250. Galderisi, M.; Cosyns, B.; Edvardsen, T.; Cardim, N.; Delgado, V.; Di Salvo, G.; Donal, E.; Sade, L. E.; Ernande, L.; Garbi, M.; Grapsa, J.; Hagendorff, A.; Kamp, O.; Magne,

- J.; Santoro, C.; Stefanidis, A.; Lancellotti, P.; Popescu, B.; Habib, G.; Committee, E. S. D.; Committee, E. S. D., Standardization of adult transthoracic echocardiography reporting in agreement with recent chamber quantification, diastolic function, and heart valve disease recommendations: an expert consensus document of the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **2017**, *18* (12), 1301-1310.
251. Yang, J.; Lei, W. R.; Wang, J. W.; Xiao, Z. Z.; Sun, C. P.; Lin, X. F.; Zheng, S. Y.; Zhu, P., Transesophageal echocardiography-guided percutaneous closure of the patent foramen ovale only uses the sheath. *Cardiovasc Diagn Ther* **2023**, *13* (4), 728-735.
252. Macallan, D. C.; Bell, J. A.; Braddick, M.; Endersby, K.; Rizzo-Naudi, J., The electrocardiogram in general practice: its use and its interpretation. *J R Soc Med* **1990**, *83* (9), 559-62.
253. Simon, A.; Megnien, J. L.; Chironi, G., The value of carotid intima-media thickness for predicting cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2010**, *30* (2), 182-5.
254. van Rosendaal, A. R.; Narula, J.; Lin, F. Y.; van den Hoogen, I. J.; Gianni, U.; Al Hussein Alawamlh, O.; Dunham, P. C.; Pena, J. M.; Lee, S. E.; Andreini, D.; Cademartiri, F.; Chinnaiyan, K.; Chow, B. J. W.; Conte, E.; Cury, R. C.; Feuchtner, G.; Hadamitzky, M.; Kim, Y. J.; Leipsic, J.; Maffei, E.; Marques, H.; de Araujo Goncalves, P.; Plank, F.; Pontone, G.; Raff, G. L.; Villines, T. C.; Weirich, H. G.; Al'Aref, S. J.; Baskaran, L.; Cho, I.; Danad, I.; Han, D.; Heo, R.; Lee, J. H.; Rivzi, A.; Stuijzand, W. J.; Gransar, H.; Lu, Y.; Sung, J. M.; Park, H. B.; Samady, H.; Stone, P. H.; Virmani, R.; Budoff, M. J.; Berman, D. S.; Chang, H. J.; Bax, J. J.; Min, J. K.; Shaw, L. J., Association of High-Density Calcified 1K Plaque With Risk of Acute Coronary Syndrome. *JAMA Cardiol* **2020**, *5* (3), 282-290.
255. Shaw, L. J.; Min, J. K.; Nasir, K.; Xie, J. X.; Berman, D. S.; Miedema, M. D.; Whelton, S. P.; Dardari, Z. A.; Rozanski, A.; Rumberger, J.; Bairey Merz, C. N.; Al-Mallah, M. H.; Budoff, M. J.; Blaha, M. J., Sex differences in calcified plaque and long-term cardiovascular mortality: observations from the CAC Consortium. *Eur Heart J* **2018**, *39* (41), 3727-3735.
256. Oikonomou, E. K.; Williams, M. C.; Kotanidis, C. P.; Desai, M. Y.; Marwan, M.; Antonopoulos, A. S.; Thomas, K. E.; Thomas, S.; Akoumianakis, I.; Fan, L. M.; Kesavan, S.; Herdman, L.; Alashi, A.; Centeno, E. H.; Lyasheva, M.; Griffin, B. P.; Flamm, S. D.; Shirodaria, C.; Sabharwal, N.; Kelion, A.; Dweck, M. R.; Van Beek, E. J. R.; Deanfield, J.; Hopewell, J. C.; Neubauer, S.; Channon, K. M.; Achenbach, S.; Newby, D. E.; Antoniades, C., A novel machine learning-derived radiotranscriptomic signature of perivascular fat improves cardiac risk prediction using coronary CT angiography. *Eur Heart J* **2019**, *40* (43), 3529-3543.
257. Ramjattan, N. A.; Lala, V.; Kousa, O.; Shams, P.; Makaryus, A. N., Coronary CT Angiography. In *StatPearls*, Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Vasimahmed Lala declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Omar Kousa declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Pirbhat Shams declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Amgad Makaryus declares no relevant financial relationships with ineligible companies., 2024.
258. Rahman, H.; Demir, O. M.; Ryan, M.; McConkey, H.; Scannell, C.; Ellis, H.; Webb, A.; Chiribiri, A.; Perera, D., Optimal Use of Vasodilators for Diagnosis of Microvascular Angina in the Cardiac Catheterization Laboratory. *Circ Cardiovasc Interv* **2020**, *13* (6), e009019.
259. Clark, A. N.; Beller, G. A., The present role of nuclear cardiology in clinical practice. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **2005**, *49* (1), 43-58.

260. Besenyi, Z.; Nagy, F. T.; Saghy, L.; Pavics, L., [(18)F-fluoro-deoxy-glucose positron emission tomography/computer tomography ((18)F-FDG-PET/CT) imaging in cardiology]. *Orv Hetil* **2019**, *160* (26), 1015-1024.
261. Werner, R. A.; Chen, X.; Rowe, S. P.; Lapa, C.; Javadi, M. S.; Higuchi, T., Recent paradigm shifts in molecular cardiac imaging-Establishing precision cardiology through novel (18)F-labeled PET radiotracers. *Trends Cardiovasc Med* **2020**, *30* (1), 11-19.
262. Wang, F. P.; Amanullah, A. M.; Kiat, H.; Friedman, J. D.; Berman, D. S., Diagnostic efficacy of stress technetium 99m-labeled sestamibi myocardial perfusion single-photon emission computed tomography in detection of coronary artery disease among patients over age 80. *J Nucl Cardiol* **1995**, *2* (5), 380-8.
263. Hachamovitch, R.; Berman, D. S., The use of nuclear cardiology in clinical decision making. *Semin Nucl Med* **2005**, *35* (1), 62-72.
264. Gottdiener, J. S., Overview of stress echocardiography: uses, advantages, and limitations. *Prog Cardiovasc Dis* **2001**, *43* (4), 315-34.
265. Cortigiani, L.; Sicari, R.; Bigi, R.; Landi, P.; Bovenzi, F.; Picano, E., Impact of gender on risk stratification by stress echocardiography. *Am J Med* **2009**, *122* (3), 301-9.
266. Picano, E.; Pasanisi, E.; Venneri, L.; Agrusta, M.; Mottola, G.; Sicari, R., Stress echocardiography. *Curr Pharm Des* **2005**, *11* (17), 2137-49.
267. Takagi, T., Diastolic stress echocardiography. *J Echocardiogr* **2017**, *15* (3), 99-109.
268. Badiani, S.; Waddingham, P.; Lloyd, G.; Bhattacharyya, S., Stress echocardiography in valvular heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **2018**, *16* (11), 795-804.
269. Guo, R.; Weingartner, S.; Siuryte, P.; C, T. S.; Fuetterer, M.; A, E. C.-W.; Suinesiaputra, A.; Jerosch-Herold, M.; Nezafat, R., Emerging Techniques in Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *J Magn Reson Imaging* **2022**, *55* (4), 1043-1059.
270. Patel, N.; Kolakalapudi, P.; Arora, G., Contrast - in cardiac magnetic resonance imaging. *Echocardiography* **2018**, *35* (3), 401-409.
271. Vlachopoulos, C.; Aznaouridis, K.; Stefanadis, C., Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* **2010**, *55* (13), 1318-27.
272. Ghiadoni, L.; Salvetti, M.; Muiesan, M. L.; Taddei, S., Evaluation of endothelial function by flow mediated dilation: methodological issues and clinical importance. *High Blood Press Cardiovasc Prev* **2015**, *22* (1), 17-22.
273. Xu, Y.; Arora, R. C.; Hiebert, B. M.; Lerner, B.; Szwajcer, A.; McDonald, K.; Rigatto, C.; Komenda, P.; Sood, M. M.; Tangri, N., Non-invasive endothelial function testing and the risk of adverse outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **2014**, *15* (7), 736-46.
274. Boutouyrie, P.; Chowienczyk, P.; Humphrey, J. D.; Mitchell, G. F., Arterial Stiffness and Cardiovascular Risk in Hypertension. *Circ Res* **2021**, *128* (7), 864-886.
275. Suominen, V.; Rantanen, T.; Venermo, M.; Saarinen, J.; Salenius, J., Prevalence and risk factors of PAD among patients with elevated ABI. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **2008**, *35* (6), 709-14.
276. Wang, T. J., Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation* **2011**, *123* (5), 551-65.
277. Collinson, P., Laboratory Medicine is Faced with the Evolution of Medical Practice. *J Med Biochem* **2017**, *36* (3), 211-215.

278. Loh, T. P.; Cooke, B. R.; Markus, C.; Zakaria, R.; Tran, M. T. C.; Ho, C. S.; Greaves, R. F.; Protocols, I. W. G. o. M. E., Method evaluation in the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* **2023**, 61 (5), 751-758.
279. Erickson, H. S.; Gannot, G.; Tangrea, M. A.; Chuaqui, R. F.; Gillespie, J. W.; Emmert-Buck, M. R., High throughput screening of normal and neoplastic tissue samples. *Comb Chem High Throughput Screen* **2010**, 13 (3), 253-67.
280. Bansal, A.; van den Boom, D.; Kammerer, S.; Honisch, C.; Adam, G.; Cantor, C. R.; Kleyn, P.; Braun, A., Association testing by DNA pooling: an effective initial screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99 (26), 16871-4.
281. Burke, R. W.; Diamondstone, B. I.; Velapoldi, R. A.; Menis, O., Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clin Chem* **1974**, 20 (7), 794-81.
282. Xiong, Q.; Wilson, W. K.; Pang, J., The Liebermann-Burchard reaction: sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid. *Lipids* **2007**, 42 (1), 87-96.
283. Kafonek, S. D.; Derby, C. A.; Bachorik, P. S., Biological variability of lipoproteins and apolipoproteins in patients referred to a lipid clinic. *Clin Chem* **1992**, 38 (6), 864-72.
284. McNamara, J. R.; Schaefer, E. J., Automated enzymatic standardized lipid analyses for plasma and lipoprotein fractions. *Clin Chim Acta* **1987**, 166 (1), 1-8.
285. Allain, C. C.; Poon, L. S.; Chan, C. S.; Richmond, W.; Fu, P. C., Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* **1974**, 20 (4), 470-5.
286. Robinet, P.; Wang, Z.; Hazen, S. L.; Smith, J. D., A simple and sensitive enzymatic method for cholesterol quantification in macrophages and foam cells. *J Lipid Res* **2010**, 51 (11), 3364-9.
287. Tabatabaei, M. S.; Ahmed, M., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol* **2022**, 2508, 115-134.
288. Shah, K.; Maghsoudlou, P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond)* **2016**, 77 (7), C98-101.
289. Aydin, S., A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* **2015**, 72, 4-15.
290. Konstantinou, G. N., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol* **2017**, 1592, 79-94.
291. de la Rica, R.; Stevens, M. M., Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nat Nanotechnol* **2012**, 7 (12), 821-4.
292. Grange, R. D.; Thompson, J. P.; Lambert, D. G., Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br J Anaesth* **2014**, 112 (2), 213-6.
293. Goldsmith, S. J., Radioimmunoassay: review of basic principles. *Semin Nucl Med* **1975**, 5 (2), 125-52.
294. Warsinke, A.; Benkert, A.; Scheller, F. W., Electrochemical immunoassays. *Fresenius J Anal Chem* **2000**, 366 (6-7), 622-34.
295. Dugal, R.; Dupuis, C.; Bertrand, M. J., Radioimmunoassay of anabolic steroids: an evaluation of three antisera for the detection of anabolic steroids in biological fluids. *Br J Sports Med* **1977**, 11 (4), 162-9.
296. Meftahi, G. H.; Bahari, Z.; Zarei Mahmoudabadi, A.; Iman, M.; Jangravi, Z., Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochem Mol Biol Educ* **2021**, 49 (4), 509-517.

297. Bass, J. J.; Wilkinson, D. J.; Rankin, D.; Phillips, B. E.; Szewczyk, N. J.; Smith, K.; Atherton, P. J., An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* **2017**, 27 (1), 4-25.
298. Colella, A. D.; Chegenii, N.; Tea, M. N.; Gibbins, I. L.; Williams, K. A.; Chataway, T. K., Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal Biochem* **2012**, 430 (2), 108-10.
299. Stastna, M.; Van Eyk, J. E., Analysis of protein isoforms: can we do it better? *Proteomics* **2012**, 12 (19-20), 2937-48.
300. Im, K.; Mareninov, S.; Diaz, M. F. P.; Yong, W. H., An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol* **2019**, 1897, 299-311.
301. Robertson, D.; Savage, K.; Reis-Filho, J. S.; Isacke, C. M., Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol* **2008**, 9, 13.
302. Sheng, W.; Zhang, C.; Mohiuddin, T. M.; Al-Rawe, M.; Zeppernick, F.; Falcone, F. H.; Meinhold-Heerlein, I.; Hussain, A. F., Multiplex Immunofluorescence: A Powerful Tool in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci* **2023**, 24 (4).
303. Faber, J. W.; Hagoort, J.; Moorman, A. F. M.; Christoffels, V. M.; Jensen, B., Quantified growth of the human embryonic heart. *Biol Open* **2021**, 10 (2).
304. Colombo, P. C.; Ashton, A. W.; Celaj, S.; Talreja, A.; Banchs, J. E.; Dubois, N. B.; Marinaccio, M.; Malla, S.; Lachmann, J.; Ware, J. A.; Le Jemtel, T. H., Biopsy coupled to quantitative immunofluorescence: a new method to study the human vascular endothelium. *J Appl Physiol (1985)* **2002**, 92 (3), 1331-8.
305. Coskun, O., Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul* **2016**, 3 (2), 156-160.
306. Cuatrecasas, P.; Wilchek, M.; Anfinsen, C. B., Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1968**, 61 (2), 636-43.
307. Neverova, I.; Van Eyk, J. E., Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2005**, 815 (1-2), 51-63.
308. Sahu, P. K.; Ramiseti, N. R.; Cecchi, T.; Swain, S.; Patro, C. S.; Panda, J., An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, 147, 590-611.
309. Nikolin, B.; Imamovic, B.; Medanhodzic-Vuk, S.; Sober, M., High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosn J Basic Med Sci* **2004**, 4 (2), 5-9.
310. Mehl, A.; Schwack, W.; Morlock, G. E., On-surface autosampling for liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2021**, 1651, 462334.
311. Russo, M.; Camillo, M. R. T.; La Tella, R.; Rigano, F.; Donato, P.; Mondello, L.; Dugo, P., Principles and applications of porous graphitic carbon stationary phase in liquid chromatography: An update. *J Chromatogr A* **2024**, 1719, 464728.
312. Wang, L.; Dembecki, J.; Jaffe, N. E.; O'Mara, B. W.; Cai, H.; Sparks, C. N.; Zhang, J.; Laino, S. G.; Russell, R. J.; Wang, M., A safe, effective, and facility compatible cleaning in place procedure for affinity resin in large-scale monoclonal antibody purification. *J Chromatogr A* **2013**, 1308, 86-95.
313. Yin, P.; Zhou, L.; Zhao, X.; Xu, G., Sample collection and preparation of biofluids and extracts for liquid chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **2015**, 1277, 51-9.
314. Regnier, F. E., High-performance liquid chromatography of biopolymers. *Science* **1983**, 222 (4621), 245-52.

315. Kiraly, M.; Dalmadine Kiss, B.; Vekey, K.; Antal, I.; Ludanyi, K., [Mass spectrometry: past and present]. *Acta Pharm Hung* **2016**, *86* (1), 3-11.
316. Zhang, G.; Annan, R. S.; Carr, S. A.; Neubert, T. A., Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. *Curr Protoc Protein Sci* **2010**, *Chapter 16*, Unit16 1.
317. Zhang, X. W.; Li, Q. H.; Xu, Z. D.; Dou, J. J., Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: a systematic review. *RSC Adv* **2020**, *10* (6), 3092-3104.
318. Han, X.; Yang, K.; Gross, R. W., Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses. *Mass Spectrom Rev* **2012**, *31* (1), 134-78.
319. Olshina, M. A.; Sharon, M., Mass Spectrometry: A Technique of Many Faces. *Q Rev Biophys* **2016**, *49*.
320. Haag, A. M., Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Adv Exp Med Biol* **2016**, *919*, 157-169.
321. Bourgoigne, E.; Wagner, M., [Sample preparation and bioanalysis in mass spectrometry]. *Ann Biol Clin (Paris)* **2015**, *73* (1), 11-23.
322. Lee, J. K.; Banerjee, S.; Nam, H. G.; Zare, R. N., Acceleration of reaction in charged microdroplets. *Q Rev Biophys* **2015**, *48* (4), 437-44.
323. Keller, B. O.; Sui, J.; Young, A. B.; Whittall, R. M., Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **2008**, *627* (1), 71-81.
324. Alsaleh, M.; Barbera, T. A.; Andrews, R. H.; Sithithaworn, P.; Khuntikeo, N.; Loilome, W.; Yongvanit, P.; Cox, I. J.; Syms, R. R. A.; Holmes, E.; Taylor-Robinson, S. D., Mass Spectrometry: A Guide for the Clinician. *J Clin Exp Hepatol* **2019**, *9* (5), 597-606.
325. Katsanis, S. H.; Katsanis, N., Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nat Rev Genet* **2013**, *14* (6), 415-26.
326. Bick, D.; Dimmock, D., Whole exome and whole genome sequencing. *Curr Opin Pediatr* **2011**, *23* (6), 594-600.
327. Skovgaard, O.; Bak, M.; Lobner-Olesen, A.; Tommerup, N., Genome-wide detection of chromosomal rearrangements, indels, and mutations in circular chromosomes by short read sequencing. *Genome Res* **2011**, *21* (8), 1388-93.
328. Garibyan, L.; Avashia, N., Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* **2013**, *133* (3), 1-4.
329. Mullis, K. B., The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* **1990**, *262* (4), 56-61, 64-5.
330. Valasek, M. A.; Repa, J. J., The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* **2005**, *29* (3), 151-9.
331. Weier, H. U.; Gray, J. W., A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *DNA* **1988**, *7* (6), 441-7.
332. Ramesh, R.; Munshi, A.; Panda, S. K., Polymerase chain reaction. *Natl Med J India* **1992**, *5* (3), 115-9.
333. Lorenz, T. C., Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* **2012**, (63), e3998.
334. VanGuilder, H. D.; Vrana, K. E.; Freeman, W. M., Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **2008**, *44* (5), 619-26.
335. Ruijter, J. M.; Barnewall, R. J.; Marsh, I. B.; Szentirmay, A. N.; Quinn, J. C.; van Houdt, R.; Gunst, Q. D.; van den Hoff, M. J. B., Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting. *Clin Chem* **2021**, *67* (6), 829-842.

336. Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R., Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **1993**, *11* (9), 1026-30.
337. Riswari, S. F.; Ma'roef, C. N.; Djauhari, H.; Kosasih, H.; Perkasa, A.; Yudhaputri, F. A.; Artika, I. M.; Williams, M.; van der Ven, A.; Myint, K. S.; Alisjahbana, B.; Ledermann, J. P.; Powers, A. M.; Jaya, U. A., Study of viremic profile in febrile specimens of chikungunya in Bandung, Indonesia. *J Clin Virol* **2016**, *74*, 61-5.
338. Arya, M.; Shergill, I. S.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N.; Patel, H. R., Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* **2005**, *5* (2), 209-19.
339. Heather, J. M.; Chain, B., The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **2016**, *107* (1), 1-8.
340. Levy, S. E.; Boone, B. E., Next-Generation Sequencing Strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2019**, *9* (7).
341. Metzker, M. L., Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* **2010**, *11* (1), 31-46.
342. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74* (12), 5463-7.
343. Sanger, F.; Coulson, A. R., A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **1975**, *94* (3), 441-8.
344. Smith, L. M.; Sanders, J. Z.; Kaiser, R. J.; Hughes, P.; Dodd, C.; Connell, C. R.; Heiner, C.; Kent, S. B.; Hood, L. E., Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **1986**, *321* (6071), 674-9.
345. Kim, S.; Misra, A., SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* **2007**, *9*, 289-320.
346. Dhas, D. B.; Ashmi, A. H.; Bhat, B. V.; Parija, S. C.; Banupriya, N., Modified low cost SNP genotyping technique using cycle threshold (Ct) & melting temperature (Tm) values in allele specific real-time PCR. *Indian J Med Res* **2015**, *142* (5), 555-62.
347. Molicotti, P.; Bua, A.; Zanetti, S., Cost-effectiveness in the diagnosis of tuberculosis: choices in developing countries. *J Infect Dev Ctries* **2014**, *8* (1), 24-38.
348. Marini, M.; Sasongko, T. H.; Watihayati, M. S.; Atif, A. B.; Hayati, F.; Gunadi; Zabidi-Hussin, Z. A.; Ravichandran, M.; Nishio, H.; Zilfalil, B. A., Allele-specific PCR for a cost-effective & time-efficient diagnostic screening of spinal muscular atrophy. *Indian J Med Res* **2012**, *135* (1), 31-5.
349. Ririe, K. M.; Rasmussen, R. P.; Wittwer, C. T., Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **1997**, *245* (2), 154-60.
350. Lindblad-Toh, K.; Tanenbaum, D. M.; Daly, M. J.; Winchester, E.; Lui, W. O.; Villapakkam, A.; Stanton, S. E.; Larsson, C.; Hudson, T. J.; Johnson, B. E.; Lander, E. S.; Meyerson, M., Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol* **2000**, *18* (9), 1001-5.
351. Govindarajan, R.; Duraiyan, J.; Kaliyappan, K.; Palanisamy, M., Microarray and its applications. *J Pharm Bioallied Sci* **2012**, *4* (Suppl 2), S310-2.
352. Brown, P. O.; Botstein, D., Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* **1999**, *21* (1 Suppl), 33-7.
353. Bumgarner, R., Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol* **2013**, Chapter 22, Unit 22 1.
354. Rubattu, S.; Volpe, M., Natriuretic Peptides in the Cardiovascular System: Multifaceted Roles in Physiology, Pathology and Therapeutics. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (16).

355. Bayes-Genis, A.; Santalo-Bel, M.; Zapico-Muniz, E.; Lopez, L.; Cotes, C.; Bellido, J.; Leta, R.; Casan, P.; Ordonez-Llanos, J., N-terminal probrain natriuretic peptide (NT-proBNP) in the emergency diagnosis and in-hospital monitoring of patients with dyspnoea and ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail* **2004**, *6* (3), 301-8.
356. Palazzuoli, A.; Gallotta, M.; Quatrini, I.; Nuti, R., Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure. *Vasc Health Risk Manag* **2010**, *6*, 411-8.
357. Christ, M.; Mueller, C., Use of natriuretic peptide assay in dyspnea. *Dtsch Arztebl Int* **2008**, *105* (6), 95-100.
358. Ralat, L. A.; Guo, Q.; Ren, M.; Funke, T.; Dickey, D. M.; Potter, L. R.; Tang, W. J., Insulin-degrading enzyme modulates the natriuretic peptide-mediated signaling response. *J Biol Chem* **2011**, *286* (6), 4670-9.
359. Potter, L. R., Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J* **2011**, *278* (11), 1808-17.
360. Filippatos, G.; Farmakis, D.; Parissis, J.; Lekakis, J., Drug therapy for patients with systolic heart failure after the PARADIGM-HF trial: in need of a new paradigm of LCZ696 implementation in clinical practice. *BMC Med* **2015**, *13*, 35.
361. Cheung, B. M.; Kumana, C. R., Natriuretic peptides--relevance in cardiovascular disease. *JAMA* **1998**, *280* (23), 1983-4.
362. Burke, M. A.; Cotts, W. G., Interpretation of B-type natriuretic peptide in cardiac disease and other comorbid conditions. *Heart Fail Rev* **2007**, *12* (1), 23-36.
363. Chiurchiu, V.; Izzi, V.; D'Aquilio, F.; Carotenuto, F.; Di Nardo, P.; Baldini, P. M., Brain Natriuretic Peptide (BNP) regulates the production of inflammatory mediators in human THP-1 macrophages. *Regul Pept* **2008**, *148* (1-3), 26-32.
364. Fu, S.; Ping, P.; Wang, F.; Luo, L., Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. *J Biol Eng* **2018**, *12*, 2.
365. Hopkins, W. E.; Chen, Z.; Fukagawa, N. K.; Hall, C.; Knot, H. J.; LeWinter, M. M., Increased atrial and brain natriuretic peptides in adults with cyanotic congenital heart disease: enhanced understanding of the relationship between hypoxia and natriuretic peptide secretion. *Circulation* **2004**, *109* (23), 2872-7.
366. Domondon, M.; Nikiforova, A. B.; DeLeon-Pennell, K. Y.; Ilatovskaya, D. V., Regulation of mitochondria function by natriuretic peptides. *Am J Physiol Renal Physiol* **2019**, *317* (5), F1164-F1168.
367. Rosjo, H.; Dahl, M. B.; Jorgensen, M.; Roysland, R.; Brynildsen, J.; Cataliotti, A.; Christensen, G.; Hoiseth, A. D.; Hagve, T. A.; Omland, T., Influence of glycosylation on diagnostic and prognostic accuracy of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in acute dyspnea: data from the Akershus Cardiac Examination 2 Study. *Clin Chem* **2015**, *61* (8), 1087-97.
368. Clerico, A.; Zaninotto, M.; Prontera, C.; Giovannini, S.; Ndreu, R.; Franzini, M.; Zucchelli, G. C.; Plebani, M.; Study Group on Cardiovascular Risk Biomarkers of the Italian Society of Clinical, B., State of the art of BNP and NT-proBNP immunoassays: the CardioOrmoCheck study. *Clin Chim Acta* **2012**, *414*, 112-9.
369. Franzini, M.; Masotti, S.; Prontera, C.; Ripoli, A.; Passino, C.; Giovannini, S.; Zucchelli, G.; Clerico, A., Systematic differences between BNP immunoassays: comparison of methods using standard protocols and quality control materials. *Clin Chim Acta* **2013**, *424*, 287-91.

370. Apple, F. S.; Panteghini, M.; Ravkilde, J.; Mair, J.; Wu, A. H.; Tate, J.; Pagani, F.; Christenson, R. H.; Jaffe, A. S.; Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the, I., Quality specifications for B-type natriuretic peptide assays. *Clin Chem* **2005**, *51* (3), 486-93.
371. Vogeser, M.; Jacob, K., B-type natriuretic peptide (BNP)--validation of an immediate response assay. *Clin Lab* **2001**, *47* (1-2), 29-33.
372. Samad, M.; Malempati, S.; Restini, C. B. A., Natriuretic Peptides as Biomarkers: Narrative Review and Considerations in Cardiovascular and Respiratory Dysfunctions. *Yale J Biol Med* **2023**, *96* (1), 137-149.
373. Gohar, A.; Rutten, F. H.; den Ruijter, H.; Kelder, J. C.; von Haehling, S.; Anker, S. D.; Mockel, M.; Hoes, A. W., Mid-regional pro-atrial natriuretic peptide for the early detection of non-acute heart failure. *Eur J Heart Fail* **2019**, *21* (10), 1219-1227.
374. Meijers, W. C.; Bayes-Genis, A.; Mebazaa, A.; Bauersachs, J.; Cleland, J. G. F.; Coats, A. J. S.; Januzzi, J. L.; Maisel, A. S.; McDonald, K.; Mueller, T.; Richards, A. M.; Seferovic, P.; Mueller, C.; de Boer, R. A., Circulating heart failure biomarkers beyond natriuretic peptides: review from the Biomarker Study Group of the Heart Failure Association (HFA), European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* **2021**, *23* (10), 1610-1632.
375. Januzzi, J. L.; van Kimmenade, R.; Lainchbury, J.; Bayes-Genis, A.; Ordonez-Llanos, J.; Santalo-Bel, M.; Pinto, Y. M.; Richards, M., NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J* **2006**, *27* (3), 330-7.
376. Ponikowski, P.; Voors, A. A.; Anker, S. D.; Bueno, H.; Cleland, J. G. F.; Coats, A. J. S.; Falk, V.; Gonzalez-Juanatey, J. R.; Harjola, V. P.; Jankowska, E. A.; Jessup, M.; Linde, C.; Nihoyannopoulos, P.; Parissis, J. T.; Pieske, B.; Riley, J. P.; Rosano, G. M. C.; Ruilope, L. M.; Ruschitzka, F.; Rutten, F. H.; van der Meer, P.; Group, E. S. C. S. D., 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* **2016**, *37* (27), 2129-2200.
377. Madamanchi, C.; Alhosaini, H.; Sumida, A.; Runge, M. S., Obesity and natriuretic peptides, BNP and NT-proBNP: mechanisms and diagnostic implications for heart failure. *Int J Cardiol* **2014**, *176* (3), 611-7.
378. Writing, C.; Maddox, T. M.; Januzzi, J. L., Jr.; Allen, L. A.; Breathett, K.; Butler, J.; Davis, L. L.; Fonarow, G. C.; Ibrahim, N. E.; Lindenfeld, J.; Masoudi, F. A.; Motiwala, S. R.; Oliveros, E.; Patterson, J. H.; Walsh, M. N.; Wasserman, A.; Yancy, C. W.; Youmans, Q. R., 2021 Update to the 2017 ACC Expert Consensus Decision Pathway for Optimization of Heart Failure Treatment: Answers to 10 Pivotal Issues About Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Report of the American College of Cardiology Solution Set Oversight Committee. *J Am Coll Cardiol* **2021**, *77* (6), 772-810.
379. Ibrahim, N. E.; Burnett, J. C., Jr.; Butler, J.; Camacho, A.; Felker, G. M.; Fiuzat, M.; O'Connor, C.; Solomon, S. D.; Vaduganathan, M.; Zile, M. R.; Januzzi, J. L., Jr., Natriuretic Peptides as Inclusion Criteria in Clinical Trials: A JACC: Heart Failure Position Paper. *JACC Heart Fail* **2020**, *8* (5), 347-358.
380. Ibrahim, N. E.; Januzzi, J. L., Jr., Established and Emerging Roles of Biomarkers in Heart Failure. *Circ Res* **2018**, *123* (5), 614-629.

381. Sciacchitano, S.; Lavra, L.; Morgante, A.; Ulivieri, A.; Magi, F.; De Francesco, G. P.; Bellotti, C.; Salehi, L. B.; Ricci, A., Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (2).
382. Dings, R. P. M.; Miller, M. C.; Griffin, R. J.; Mayo, K. H., Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (3).
383. Dong, R.; Zhang, M.; Hu, Q.; Zheng, S.; Soh, A.; Zheng, Y.; Yuan, H., Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med* **2018**, *41* (2), 599-614.
384. Dumin, J.; Dabelic, S.; Fogel, M., Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1760* (4), 616-35.
385. Gao, Z.; Liu, Z.; Wang, R.; Zheng, Y.; Li, H.; Yang, L., Galectin-3 Is a Potential Mediator for Atherosclerosis. *J Immunol Res* **2020**, *2020*, 5284728.
386. Menini, S.; Iacobini, C.; Ricci, C.; Blasetti Fantauzzi, C.; Salvi, L.; Pesce, C. M.; Relucanti, M.; Familiari, G.; Taurino, M.; Pugliese, G., The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **2013**, *100* (3), 472-80.
387. Sharma, U. C.; Pokharel, S.; van Brakel, T. J.; van Berlo, J. H.; Cleutjens, J. P.; Schroen, B.; Andre, S.; Crijns, H. J.; Gubius, H. J.; Maessen, J.; Pinto, Y. M., Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* **2004**, *110* (19), 3121-8.
388. Suthahar, N.; Meijers, W. C.; Sillje, H. H. W.; de Boer, R. A., From Inflammation to Fibrosis-Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Tissue Remodelling and Perspectives on Differential Treatment Opportunities. *Curr Heart Fail Rep* **2017**, *14* (4), 235-250.
389. de Boer, R. A.; Voors, A. A.; Muntendam, P.; van Gilst, W. H.; van Veldhuisen, D. J., Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail* **2009**, *11* (9), 811-7.
390. Goldberger, J. J.; Arora, R.; Green, D.; Greenland, P.; Lee, D. C.; Lloyd-Jones, D. M.; Markl, M.; Ng, J.; Shah, S. J., Evaluating the Atrial Myopathy Underlying Atrial Fibrillation: Identifying the Arrhythmogenic and Thrombogenic Substrate. *Circulation* **2015**, *132* (4), 278-91.
391. Schindler, E. I.; Szymanski, J. J.; Hock, K. G.; Geltman, E. M.; Scott, M. G., Short- and Long-term Biologic Variability of Galectin-3 and Other Cardiac Biomarkers in Patients with Stable Heart Failure and Healthy Adults. *Clin Chem* **2016**, *62* (2), 360-6.
392. Issa, S. F.; Christensen, A. F.; Lottenburger, T.; Junker, K.; Lindegaard, H.; Horslev-Petersen, K.; Junker, P., Within-day variation and influence of physical exercise on circulating Galectin-3 in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Scand J Immunol* **2015**, *82* (1), 70-5.
393. de Boer, R. A.; Lok, D. J.; Jaarsma, T.; van der Meer, P.; Voors, A. A.; Hillege, H. L.; van Veldhuisen, D. J., Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Ann Med* **2011**, *43* (1), 60-8.
394. Kanukurti, J.; Mohammed, N.; Sreedevi, N. N.; Khan, S. A.; Baba, K.; Bhaskar, M. V.; Satish, O. S.; Naushad, S. M.; Mohan, I. K., Evaluation of Galectin-3 as a Novel Diagnostic Biomarker in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *J Lab Physicians* **2020**, *12* (2), 126-132.
395. Meijers, W. C.; van der Velde, A. R.; de Boer, R. A., The ARCHITECT galectin-3 assay: comparison with other automated and manual assays for the measurement of circulating galectin-3 levels in heart failure. *Expert Rev Mol Diagn* **2014**, *14* (3), 257-66.

396. Gruson, D.; Mancini, M.; Ahn, S. A.; Rousseau, M. F., Measurement of Galectin-3 with the ARCHITECT assay: Clinical validity and cost-effectiveness in patients with heart failure. *Clin Biochem* **2014**, *47* (12), 1006-9.
397. Christenson, R. H.; Duh, S. H.; Wu, A. H.; Smith, A.; Abel, G.; deFilippi, C. R.; Wang, S.; Adourian, A.; Adiletto, C.; Gardiner, P., Multi-center determination of galectin-3 assay performance characteristics: Anatomy of a novel assay for use in heart failure. *Clin Biochem* **2010**, *43* (7-8), 683-90.
398. Chow, S. L.; Maisel, A. S.; Anand, I.; Bozkurt, B.; de Boer, R. A.; Felker, G. M.; Fonarow, G. C.; Greenberg, B.; Januzzi, J. L., Jr.; Kiernan, M. S.; Liu, P. P.; Wang, T. J.; Yancy, C. W.; Zile, M. R.; American Heart Association Clinical Pharmacology Committee of the Council on Clinical, C.; Council on Basic Cardiovascular, S.; Council on Cardiovascular Disease in the, Y.; Council on, C.; Stroke, N.; Council on Cardiopulmonary, C. C. P.; Resuscitation; Council on, E.; Prevention; Council on Functional, G.; Translational, B.; Council on Quality of, C.; Outcomes, R., Role of Biomarkers for the Prevention, Assessment, and Management of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **2017**, *135* (22), e1054-e1091.
399. McCullough, P. A.; Olobatoke, A.; Vanhecke, T. E., Galectin-3: a novel blood test for the evaluation and management of patients with heart failure. *Rev Cardiovasc Med* **2011**, *12* (4), 200-10.
400. Gehlken, C.; Suthahar, N.; Meijers, W. C.; de Boer, R. A., Galectin-3 in Heart Failure: An Update of the Last 3 Years. *Heart Fail Clin* **2018**, *14* (1), 75-92.
401. Asleh, R.; Enriquez-Sarano, M.; Jaffe, A. S.; Manemann, S. M.; Weston, S. A.; Jiang, R.; Roger, V. L., Galectin-3 Levels and Outcomes After Myocardial Infarction: A Population-Based Study. *J Am Coll Cardiol* **2019**, *73* (18), 2286-2295.
402. Kakkar, R.; Lee, R. T., The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7* (10), 827-40.
403. Baba, Y.; Maeda, K.; Yashiro, T.; Inage, E.; Kasakura, K.; Suzuki, R.; Niyonsaba, F.; Hara, M.; Tanabe, A.; Ogawa, H.; Okumura, K.; Ohtsuka, Y.; Shimizu, T.; Nishiyama, C., GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *J Biol Chem* **2012**, *287* (39), 32689-96.
404. Pascual-Figal, D. A.; Perez-Martinez, M. T.; Asensio-Lopez, M. C.; Sanchez-Mas, J.; Garcia-Garcia, M. E.; Martinez, C. M.; Lencina, M.; Jara, R.; Januzzi, J. L.; Lax, A., Pulmonary Production of Soluble ST2 in Heart Failure. *Circ Heart Fail* **2018**, *11* (12), e005488.
405. Pascual-Figal, D. A.; Januzzi, J. L., The biology of ST2: the International ST2 Consensus Panel. *Am J Cardiol* **2015**, *115* (7 Suppl), 3B-7B.
406. Weinberg, E. O.; Shimp, M.; De Keulenaer, G. W.; MacGillivray, C.; Tominaga, S.; Solomon, S. D.; Rouleau, J. L.; Lee, R. T., Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation* **2002**, *106* (23), 2961-6.
407. Pfetsch, V.; Sanin, V.; Jaensch, A.; Dallmeier, D.; Mons, U.; Brenner, H.; Koenig, W.; Rothenbacher, D., Increased Plasma Concentrations of Soluble ST2 Independently Predict Mortality but not Cardiovascular Events in Stable Coronary Heart Disease Patients: 13-Year Follow-up of the KAROLA Study. *Cardiovasc Drugs Ther* **2017**, *31* (2), 167-177.
408. Dieplinger, B.; Januzzi, J. L., Jr.; Steinmair, M.; Gabriel, C.; Poelz, W.; Haltmayer, M.; Mueller, T., Analytical and clinical evaluation of a novel high-sensitivity assay for

- measurement of soluble ST2 in human plasma--the Presage ST2 assay. *Clin Chim Acta* **2009**, *409* (1-2), 33-40.
409. Mueller, T.; Zimmermann, M.; Dieplinger, B.; Ankersmit, H. J.; Haltmayer, M., Comparison of plasma concentrations of soluble ST2 measured by three different commercially available assays: the MBL ST2 assay, the Presage ST2 assay, and the R&D ST2 assay. *Clin Chim Acta* **2012**, *413* (19-20), 1493-4.
410. Lu, J.; Snider, J. V.; Grenache, D. G., Establishment of reference intervals for soluble ST2 from a United States population. *Clin Chim Acta* **2010**, *411* (21-22), 1825-6.
411. Mueller, T.; Dieplinger, B., The Presage((R)) ST2 Assay: analytical considerations and clinical applications for a high-sensitivity assay for measurement of soluble ST2. *Expert Rev Mol Diagn* **2013**, *13* (1), 13-30.
412. Januzzi, J. L., Jr.; Peacock, W. F.; Maisel, A. S.; Chae, C. U.; Jesse, R. L.; Baggish, A. L.; O'Donoghue, M.; Sakhuja, R.; Chen, A. A.; van Kimmenade, R. R.; Lewandowski, K. B.; Lloyd-Jones, D. M.; Wu, A. H., Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study. *J Am Coll Cardiol* **2007**, *50* (7), 607-13.
413. Januzzi, J. L.; Mebazaa, A.; Di Somma, S., ST2 and prognosis in acutely decompensated heart failure: the International ST2 Consensus Panel. *Am J Cardiol* **2015**, *115* (7 Suppl), 26B-31B.
414. Manzano-Fernandez, S.; Januzzi, J. L.; Pastor-Perez, F. J.; Bonaque-Gonzalez, J. C.; Boronat-Garcia, M.; Pascual-Figal, D. A.; Montalban-Larrea, S.; Navarro-Penalver, M.; Andreu-Cayuelas, J. M.; Valdes, M., Serial monitoring of soluble interleukin family member ST2 in patients with acutely decompensated heart failure. *Cardiology* **2012**, *122* (3), 158-66.
415. Ky, B.; French, B.; McCloskey, K.; Rame, J. E.; McIntosh, E.; Shahi, P.; Dries, D. L.; Tang, W. H.; Wu, A. H.; Fang, J. C.; Boxer, R.; Sweitzer, N. K.; Levy, W. C.; Goldberg, L. R.; Jessup, M.; Cappola, T. P., High-sensitivity ST2 for prediction of adverse outcomes in chronic heart failure. *Circ Heart Fail* **2011**, *4* (2), 180-7.
416. Felker, G. M.; Fiuzat, M.; Thompson, V.; Shaw, L. K.; Neely, M. L.; Adams, K. F.; Whellan, D. J.; Donahue, M. P.; Ahmad, T.; Kitzman, D. W.; Pina, I. L.; Zannad, F.; Kraus, W. E.; O'Connor, C. M., Soluble ST2 in ambulatory patients with heart failure: Association with functional capacity and long-term outcomes. *Circ Heart Fail* **2013**, *6* (6), 1172-9.
417. Yancy, C. W.; Jessup, M.; Bozkurt, B.; Butler, J.; Casey, D. E., Jr.; Colvin, M. M.; Drazner, M. H.; Filippatos, G. S.; Fonarow, G. C.; Givertz, M. M.; Hollenberg, S. M.; Lindenfeld, J.; Masoudi, F. A.; McBride, P. E.; Peterson, P. N.; Stevenson, L. W.; Westlake, C., 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation* **2017**, *136* (6), e137-e161.
418. Katrukha, I. A., Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* **2013**, *78* (13), 1447-65.
419. Gomes, A. V.; Potter, J. D.; Szczesna-Cordary, D., The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB Life* **2002**, *54* (6), 323-33.
420. Thygesen, K.; Alpert, J. S.; Jaffe, A. S.; Chaitman, B. R.; Bax, J. J.; Morrow, D. A.; White, H. D.; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology /American College of Cardiology /American Heart Association /World Heart Federation

Task Force for the Universal Definition of Myocardial, I., Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Glob Heart* **2018**, 13 (4), 305-338.

421. Chaulin, A. M., Elevation Mechanisms and Diagnostic Consideration of Cardiac Troponins under Conditions Not Associated with Myocardial Infarction. Part 1. *Life (Basel)* **2021**, 11 (9).

422. Jaffe, A. S.; Wu, A. H., Troponin release--reversible or irreversible injury? Should we care? *Clin Chem* **2012**, 58 (1), 148-50.

423. Katus, H. A.; Remppis, A.; Looser, S.; Hallermeier, K.; Scheffold, T.; Kubler, W., Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J Mol Cell Cardiol* **1989**, 21 (12), 1349-53.

424. van der Linden, N.; Hilderink, J. M.; Cornelis, T.; Kimenai, D. M.; Klinkenberg, L. J. J.; van Doorn, W. P.; Litjens, E. J. R.; van Suijlen, J. D. E.; van Loon, L. J. C.; Bekers, O.; Kooman, J. P.; Meex, S. J. R., Twenty-Four-Hour Biological Variation Profiles of Cardiac Troponin I in Individuals with or without Chronic Kidney Disease. *Clin Chem* **2017**, 63 (10), 1655-1656.

425. Potter, J. M.; Hickman, P. E.; Cullen, L., Troponins in myocardial infarction and injury. *Aust Prescr* **2022**, 45 (2), 53-57.

426. Collet, J. P.; Thiele, H.; Barbato, E.; Barthelémy, O.; Bauersachs, J.; Bhatt, D. L.; Dendale, P.; Dorobantu, M.; Edvardsen, T.; Folliguet, T.; Gale, C. P.; Gilard, M.; Jobs, A.; Juni, P.; Lambrinou, E.; Lewis, B. S.; Mehilli, J.; Meliga, E.; Merkely, B.; Mueller, C.; Roffi, M.; Rutten, F. H.; Sibbing, D.; Siontis, G. C. M.; Group, E. S. C. S. D., 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* **2021**, 42 (14), 1289-1367.

427. Chaulin, A., Clinical and Diagnostic Value of Highly Sensitive Cardiac Troponins in Arterial Hypertension. *Vasc Health Risk Manag* **2021**, 17, 431-443.

428. Koerbin, G.; Tate, J.; Potter, J. M.; Cavanaugh, J.; Glasgow, N.; Hickman, P. E., Characterisation of a highly sensitive troponin I assay and its application to a cardio-healthy population. *Clin Chem Lab Med* **2012**, 50 (5), 871-8.

429. Chaulin, A. M., Cardiac Troponins Metabolism: From Biochemical Mechanisms to Clinical Practice (Literature Review). *Int J Mol Sci* **2021**, 22 (20).

430. Ward, G.; Simpson, A.; Boscato, L.; Hickman, P. E., The investigation of interferences in immunoassay. *Clin Biochem* **2017**, 50 (18), 1306-1311.

431. Yu, S. R.; Zhang, C. Y.; Xiong, W. J.; Chen, J. T.; Song, J. X.; Chen, H., An Hypothesis: Disproportion Between Cardiac Troponin and B-Type Natriuretic Peptide Levels-A High Risk and Poor Prognostic Biomarker in Patients With Fulminant Myocarditis? *Heart Lung Circ* **2021**, 30 (6), 837-842.

432. Yafasova, A.; Butt, J. H.; Rorth, R., Troponin: an important prognostic biomarker in patients with heart failure and reduced ejection fraction? *Eur J Heart Fail* **2021**, 23 (9), 1539-1540.

433. Sabbatinelli, J.; Giuliani, A.; Bonfigli, A. R.; Ramini, D.; Matakchione, G.; Campolucci, C.; Ceka, A.; Tortato, E.; Rippo, M. R.; Procopio, A. D.; Moretti, M.; Olivieri, F., Prognostic value of soluble ST2, high-sensitivity cardiac troponin, and NT-proBNP in type 2 diabetes: a 15-year retrospective study. *Cardiovasc Diabetol* **2022**, 21 (1), 180.

434. Quesada, A.; Lopez-Valero, L.; Marcaida-Benito, G.; Bello, J. J.; Quesada-Ocete, J.; Rubini-Costa, R.; Quesada-Ocete, B.; Rubini-Puig, R.; Ferez-Marti, A.; Del Moral-Ronda, V.; Palanca-Gil, V.; de la Guia-Galipienso, F.; Lavie, C. J.; Lippi, G.; Sanchis-Gomar, F., Prognostic value of troponin I in atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis* **2021**, 67, 80-88.

435. Ordway, G. A.; Garry, D. J., Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol* **2004**, *207* (Pt 20), 3441-6.
436. Mair, J.; Artner-Dworzak, E.; Lechleitner, P.; Morass, B.; Smidt, J.; Wagner, I.; Dienstl, F.; Puschendorf, B., Early diagnosis of acute myocardial infarction by a newly developed rapid immunoturbidimetric assay for myoglobin. *Br Heart J* **1992**, *68* (5), 462-8.
437. Jurlander, B.; Clemmensen, P.; Wagner, G. S.; Grande, P., Very early diagnosis and risk stratification of patients admitted with suspected acute myocardial infarction by the combined evaluation of a single serum value of cardiac troponin-T, myoglobin, and creatine kinase MB(mass). *Eur Heart J* **2000**, *21* (5), 382-9.
438. de Lemos, J. A.; Morrow, D. A.; Gibson, C. M.; Murphy, S. A.; Sabatine, M. S.; Rifai, N.; McCabe, C. H.; Antman, E. M.; Cannon, C. P.; Braunwald, E., The prognostic value of serum myoglobin in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. Results from the TIMI 11B and TACTICS-TIMI 18 studies. *J Am Coll Cardiol* **2002**, *40* (2), 238-44.
439. Cabral, B. M. I.; Edding, S. N.; Portocarrero, J. P.; Lerma, E. V., Rhabdomyolysis. *Dis Mon* **2020**, *66* (8), 101015.
440. Matveeva, E.; Gryczynski, Z.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Lakowicz, J. R., Myoglobin immunoassay utilizing directional surface plasmon-coupled emission. *Anal Chem* **2004**, *76* (21), 6287-92.
441. Pagani, F.; Bonetti, G.; Stefini, F.; Cuccia, C.; Panteghini, M., Serum and plasma samples for ACS:systems cardiac markers. *Clin Chem* **2000**, *46* (7), 1020-2.
442. Claps, G.; Faouzi, S.; Quidville, V.; Chehade, F.; Shen, S.; Vagner, S.; Robert, C., The multiple roles of LDH in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2022**, *19* (12), 749-762.
443. Schmiechen, N. J.; Han, C.; Milzman, D. P., ED use of rapid lactate to evaluate patients with acute chest pain. *Ann Emerg Med* **1997**, *30* (5), 571-7.
444. Heinova, D.; Rosival, I.; Avidar, Y.; Bogin, E., Lactate dehydrogenase isoenzyme distribution and patterns in chicken organs. *Res Vet Sci* **1999**, *67* (3), 309-12.
445. Gordon, J. S.; Wood, C. T.; Luc, J. G. Y.; Watson, R. A.; Maynes, E. J.; Choi, J. H.; Morris, R. J.; Massey, H. T.; Throckmorton, A. L.; Tchantchaleishvili, V., Clinical implications of LDH isoenzymes in hemolysis and continuous-flow left ventricular assist device-induced thrombosis. *Artif Organs* **2020**, *44* (3), 231-238.
446. Liu, F.; Belding, R.; Usategui-Gomez, M.; Reynoso, G., Immunochemical determination of LDH-1. *Am J Clin Pathol* **1981**, *75* (5), 701-7.
447. McLeish, M. J.; Kenyon, G. L., Relating structure to mechanism in creatine kinase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2005**, *40* (1), 1-20.
448. Kim, S.; Um, T. H.; Cho, C. R.; Jeon, J. S., False-positive elevation of creatine kinase MB mass concentrations caused by macromolecules in a patient who underwent nephrectomy for renal cell carcinoma. *Ann Lab Med* **2014**, *34* (5), 405-7.
449. Hawkins, R. C.; Tan, H. L., Comparison of the diagnostic utility of CK, CK-MB (activity and mass), troponin T and troponin I in patients with suspected acute myocardial infarction. *Singapore Med J* **1999**, *40* (11), 680-4.
450. Hartman, M. H. T.; Eppinga, R. N.; Vlaar, P. J. J.; Lexis, C. P. H.; Lipsic, E.; Haec, J. D. E.; van Veldhuisen, D. J.; van der Horst, I. C. C.; van der Harst, P., The contemporary value of peak creatine kinase-MB after ST-segment elevation myocardial infarction above other clinical and angiographic characteristics in predicting infarct size, left ventricular ejection fraction, and mortality. *Clin Cardiol* **2017**, *40* (5), 322-328.

451. Lippi, G.; von Meyer, A.; Cadamuro, J.; Simundic, A. M., Blood sample quality. *Diagnosis (Berl)* **2019**, 6 (1), 25-31.
452. Kanemitsu, F.; Okigaki, T., Creatine kinase isoenzymes. *J Chromatogr* **1988**, 429, 399-417.
453. Ladue, J. S.; Wroblewski, F.; Karmen, A., Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science* **1954**, 120 (3117), 497-9.
454. Lee, C. O.; Li, H. L.; Tsoi, M. F.; Cheung, C. L.; Cheung, B. M. Y., Association between the liver fat score (LFS) and cardiovascular diseases in the national health and nutrition examination survey 1999-2016. *Ann Med* **2021**, 53 (1), 1065-1073.
455. Kim, H. J.; Kim, S. Y.; Shin, S. P.; Yang, Y. J.; Bang, C. S.; Baik, G. H.; Kim, D. J.; Ham, Y. L.; Choi, E. Y.; Suk, K. T., Immunological measurement of aspartate/alanine aminotransferase in predicting liver fibrosis and inflammation. *Korean J Intern Med* **2020**, 35 (2), 320-330.
456. Pierre-Paul, D.; Gahtan, V., Noncholesterol-lowering effects of statins. *Vasc Endovascular Surg* **2003**, 37 (5), 301-13.
457. Montecucco, F.; Mach, F., New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor. *Clin Interv Aging* **2008**, 3 (2), 341-9.
458. Zhang, X. L.; Lan, R. F.; Zhang, X. W.; Xu, W.; Wang, L.; Kang, L. N.; Xu, B., Association Between Baseline, Achieved, and Reduction of CRP and Cardiovascular Outcomes After LDL Cholesterol Lowering with Statins or Ezetimibe: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc* **2019**, 8 (16), e012428.
459. Mora, S.; Ridker, P. M., Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)--can C-reactive protein be used to target statin therapy in primary prevention? *Am J Cardiol* **2006**, 97 (2A), 33A-41A.
460. Venugopal, S. K.; Devaraj, S.; Yuhanna, I.; Shaul, P.; Jialal, I., Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* **2002**, 106 (12), 1439-41.
461. Gedebjerg, A.; Bjerre, M.; Kjaergaard, A. D.; Nielsen, J. S.; Rungby, J.; Brandslund, I.; Maeng, M.; Beck-Nielsen, H.; Vaag, A.; Sorensen, H. T.; Hansen, T. K.; Thomsen, R. W., CRP, C-Peptide, and Risk of First-Time Cardiovascular Events and Mortality in Early Type 2 Diabetes: A Danish Cohort Study. *Diabetes Care* **2023**, 46 (5), 1037-1045.
462. Ebrahimi, M.; Heidari-Bakavoli, A. R.; Shoeibi, S.; Mirhafez, S. R.; Moohebaty, M.; Esmaily, H.; Ghazavi, H.; Saberi Karimian, M.; Parizadeh, S. M.; Mohammadi, M.; Mohaddes Ardabili, H.; Ferns, G. A.; Ghayour-Mobarhan, M., Association of Serum hs-CRP Levels With the Presence of Obesity, Diabetes Mellitus, and Other Cardiovascular Risk Factors. *J Clin Lab Anal* **2016**, 30 (5), 672-6.
463. Thompson, D.; Pepys, M. B.; Wood, S. P., The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* **1999**, 7 (2), 169-77.
464. Miller, D. T.; Zee, R. Y.; Suk Danik, J.; Kozlowski, P.; Chasman, D. I.; Lazarus, R.; Cook, N. R.; Ridker, P. M.; Kwiatkowski, D. J., Association of common CRP gene variants with CRP levels and cardiovascular events. *Ann Hum Genet* **2005**, 69 (Pt 6), 623-38.
465. Ziv-Baran, T.; Shenhar-Tsarfaty, S.; Etz-Hadar, I.; Goldiner, I.; Gottreich, A.; Alcalay, Y.; Zeltser, D.; Shapira, I.; Angel, Y.; Friedensohn, L.; Ehrenwald, M.; Berliner, S.; Rogowski, O., The ability of the wide range CRP assay to classify individuals with low grade inflammation into cardiovascular risk groups. *Clin Chim Acta* **2017**, 471, 185-190.

466. Coelho Graca, D.; Golaz, O.; Magnin, J. L.; Fleurkens, H.; Rossier, M. F.; Lescuyer, P.; Vuilleumier, N., CRP-Based Cardiovascular Risk Assessment: New Conventional CRP Assay Fit for Purpose? *J Appl Lab Med* **2018**, 2 (6), 952-959.
467. Kusnierz-Cabala, B.; Gernand, W.; Zabek-Adamska, A.; Tokarz, A.; Naskalski, J. W., Comparison of high-sensitivity C-reactive protein serum assay results obtained using Dade-Behring BNII nephelometer and Ortho Vitros FS 5.1 clinical analyzer in respect of CRP-related risk assessment of chronic metabolic diseases. *Clin Lab* **2008**, 54 (9-10), 341-6.
468. de Maat, M. P.; Haverkate, F.; Kluft, C., Relationship between CRP and clinical course of unstable angina depends on assay method. *Vascul Pharmacol* **2002**, 39 (3), 113-5.
469. Bastard, J. P.; Maachi, M.; Lagathu, C.; Kim, M. J.; Caron, M.; Vidal, H.; Capeau, J.; Feve, B., Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* **2006**, 17 (1), 4-12.
470. Roivainen, M.; Viik-Kajander, M.; Palosuo, T.; Toivanen, P.; Leinonen, M.; Saikku, P.; Tenkanen, L.; Manninen, V.; Hovi, T.; Manttari, M., Infections, inflammation, and the risk of coronary heart disease. *Circulation* **2000**, 101 (3), 252-7.
471. Pearson, T. A.; Mensah, G. A.; Alexander, R. W.; Anderson, J. L.; Cannon, R. O., 3rd; Criqui, M.; Fadl, Y. Y.; Fortmann, S. P.; Hong, Y.; Myers, G. L.; Rifai, N.; Smith, S. C., Jr.; Taubert, K.; Tracy, R. P.; Vinicor, F.; Centers for Disease, C.; Prevention; American Heart, A., Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* **2003**, 107 (3), 499-511.
472. Abramson, J. L.; Vaccarino, V., Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults. *Arch Intern Med* **2002**, 162 (11), 1286-92.
473. Ridker, P. M.; Cushman, M.; Stampfer, M. J.; Tracy, R. P.; Hennekens, C. H., Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* **1997**, 336 (14), 973-9.
474. Kandelouei, T.; Abbasifard, M.; Imani, D.; Aslani, S.; Razi, B.; Fasihi, M.; Shafiekhani, S.; Mohammadi, K.; Jamialahmadi, T.; Reiner, Z.; Sahebkar, A., Effect of Statins on Serum level of hs-CRP and CRP in Patients with Cardiovascular Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Mediators Inflamm* **2022**, 2022, 8732360.
475. Giugliano, R. P.; Pedersen, T. R.; Park, J. G.; De Ferrari, G. M.; Gaciong, Z. A.; Ceska, R.; Toth, K.; Gouni-Berthold, I.; Lopez-Miranda, J.; Schiele, F.; Mach, F.; Ott, B. R.; Kanevsky, E.; Pineda, A. L.; Somaratne, R.; Wasserman, S. M.; Keech, A. C.; Sever, P. S.; Sabatine, M. S.; Investigators, F., Clinical efficacy and safety of achieving very low LDL-cholesterol concentrations with the PCSK9 inhibitor evolocumab: a prespecified secondary analysis of the FOURIER trial. *Lancet* **2017**, 390 (10106), 1962-1971.
476. Mach, F.; Baigent, C.; Catapano, A. L.; Koskinas, K. C.; Casula, M.; Badimon, L.; Chapman, M. J.; De Backer, G. G.; Delgado, V.; Ference, B. A.; Graham, I. M.; Halliday, A.; Landmesser, U.; Mihaylova, B.; Pedersen, T. R.; Riccardi, G.; Richter, D. J.; Sabatine, M. S.; Taskinen, M. R.; Tokgozoglu, L.; Wiklund, O.; Group, E. S. C. S. D., 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* **2020**, 41 (1), 111-188.

477. Boren, J.; Chapman, M. J.; Krauss, R. M.; Packard, C. J.; Bentzon, J. F.; Binder, C. J.; Daemen, M. J.; Demer, L. L.; Hegele, R. A.; Nicholls, S. J.; Nordestgaard, B. G.; Watts, G. F.; Bruckert, E.; Fazio, S.; Ference, B. A.; Graham, I.; Horton, J. D.; Landmesser, U.; Laufs, U.; Masana, L.; Pasterkamp, G.; Raal, F. J.; Ray, K. K.; Schunkert, H.; Taskinen, M. R.; van de Sluis, B.; Wiklund, O.; Tokgozoglu, L.; Catapano, A. L.; Ginsberg, H. N., Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* **2020**, *41* (24), 2313-2330.
478. Nordestgaard, B. G., Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: New Insights From Epidemiology, Genetics, and Biology. *Circ Res* **2016**, *118* (4), 547-63.
479. Ginsberg, H. N.; Packard, C. J.; Chapman, M. J.; Boren, J.; Aguilar-Salinas, C. A.; Aversa, M.; Ference, B. A.; Gaudet, D.; Hegele, R. A.; Kersten, S.; Lewis, G. F.; Lichtenstein, A. H.; Moulin, P.; Nordestgaard, B. G.; Remaley, A. T.; Staels, B.; Stroes, E. S. G.; Taskinen, M. R.; Tokgozoglu, L. S.; Tybjaerg-Hansen, A.; Stock, J. K.; Catapano, A. L., Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies-a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* **2021**, *42* (47), 4791-4806.
480. Langlois, M. R.; Chapman, M. J.; Cobbaert, C.; Mora, S.; Remaley, A. T.; Ros, E.; Watts, G. F.; Boren, J.; Baum, H.; Bruckert, E.; Catapano, A.; Descamps, O. S.; von Eckardstein, A.; Kamstrup, P. R.; Kolovou, G.; Kronenberg, F.; Langsted, A.; Pulkki, K.; Rifai, N.; Synniewska, G.; Wiklund, O.; Nordestgaard, B. G.; European Atherosclerosis, S.; the European Federation of Clinical, C.; Laboratory Medicine Joint Consensus, I., Quantifying Atherogenic Lipoproteins: Current and Future Challenges in the Era of Personalized Medicine and Very Low Concentrations of LDL Cholesterol. A Consensus Statement from EAS and EFLM. *Clin Chem* **2018**, *64* (7), 1006-1033.
481. Chang, C. H.; Yeh, S. T.; Ooi, S. W.; Li, C. Y.; Chen, H. F., The relationship of low-density lipoprotein cholesterol and all-cause or cardiovascular mortality in patients with type 2 diabetes: a retrospective study. *PeerJ* **2023**, *11*, e14609.
482. Tsimikas, S., In Search of Patients With Elevated Lp(a): Seek and Ye Shall Find. *J Am Coll Cardiol* **2019**, *73* (9), 1040-1042.
483. Grundy, S. M.; Stone, N. J.; Bailey, A. L.; Beam, C.; Birtcher, K. K.; Blumenthal, R. S.; Braun, L. T.; de Ferranti, S.; Faiella-Tommasino, J.; Forman, D. E.; Goldberg, R.; Heidenreich, P. A.; Hlatky, M. A.; Jones, D. W.; Lloyd-Jones, D.; Lopez-Pajares, N.; Ndumele, C. E.; Orringer, C. E.; Peralta, C. A.; Saseen, J. J.; Smith, S. C., Jr.; Sperling, L.; Virani, S. S.; Yeboah, J., 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* **2019**, *73* (24), 3168-3209.
484. Friedewald, W. T.; Levy, R. I.; Fredrickson, D. S., Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* **1972**, *18* (6), 499-502.
485. Packard, C. J., Remnants, LDL, and the Quantification of Lipoprotein-Associated Risk in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep* **2022**, *24* (3), 133-142.

486. Packard, C. J.; Demant, T.; Stewart, J. P.; Bedford, D.; Caslake, M. J.; Schwertfeger, G.; Bedynek, A.; Shepherd, J.; Seidel, D., Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J Lipid Res* **2000**, *41* (2), 305-18.
487. Ito, Y.; Fujimura, M.; Ohta, M.; Hirano, T., Development of a homogeneous assay for measurement of small dense LDL cholesterol. *Clin Chem* **2011**, *57* (1), 57-65.
488. Matyus, S. P.; Braun, P. J.; Wolak-Dinsmore, J.; Jeyarajah, E. J.; Shalaurova, I.; Xu, Y.; Warner, S. M.; Clement, T. S.; Connelly, M. A.; Fischer, T. J., NMR measurement of LDL particle number using the Vantera Clinical Analyzer. *Clin Biochem* **2014**, *47* (16-17), 203-10.
489. Hoogeveen, R. C.; Ballantyne, C. M., Residual Cardiovascular Risk at Low LDL: Remnants, Lipoprotein(a), and Inflammation. *Clin Chem* **2021**, *67* (1), 143-153.
490. Robinson, J. G., Are you targeting non-high-density lipoprotein cholesterol? *J Am Coll Cardiol* **2009**, *55* (1), 42-4.
491. Huang, F.; Wang, K.; Shen, J., Lipoprotein-associated phospholipase A2: The story continues. *Med Res Rev* **2020**, *40* (1), 79-134.
492. Dennis, E. A.; Cao, J.; Hsu, Y. H.; Magrioti, V.; Kokotos, G., Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* **2011**, *111* (10), 6130-85.
493. Stafforini, D. M., Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovasc Drugs Ther* **2009**, *23* (1), 73-83.
494. Tellis, C. C.; Tselepis, A. D., Pathophysiological role and clinical significance of lipoprotein-associated phospholipase A(2) (Lp-PLA(2)) bound to LDL and HDL. *Curr Pharm Des* **2014**, *20* (40), 6256-69.
495. Zalewski, A.; Macphee, C., Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**, *25* (5), 923-31.
496. Bui, Q. T.; Wilensky, R. L., Darapladib. *Expert Opin Investig Drugs* **2010**, *19* (1), 161-8.
497. Erlanson, D. A.; Fesik, S. W.; Hubbard, R. E.; Jahnke, W.; Jhoti, H., Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15* (9), 605-619.
498. Stafforini, D. M., Plasma PAF-AH (PLA2G7): Biochemical Properties, Association with LDLs and HDLs, and Regulation of Expression. *Enzymes* **2015**, *38*, 71-93.
499. Anuurad, E.; Ozturk, Z.; Enkhmaa, B.; Pearson, T. A.; Berglund, L., Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 with coronary artery disease in African-Americans and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* **2010**, *95* (5), 2376-83.
500. Kizer, J. R.; Umans, J. G.; Zhu, J.; Devereux, R. B.; Wolfert, R. L.; Lee, E. T.; Howard, B. V., Lipoprotein-associated phospholipase A(2) mass and activity and risk of cardiovascular disease in a population with high prevalences of obesity and diabetes: the Strong Heart Study. *Diabetes Care* **2012**, *35* (4), 840-7.
501. Capoulade, R.; Mahmut, A.; Tastet, L.; Arsenault, M.; Bedard, E.; Dumesnil, J. G.; Despres, J. P.; Larose, E.; Arsenault, B. J.; Bosse, Y.; Mathieu, P.; Pibarot, P., Impact of plasma Lp-PLA2 activity on the progression of aortic stenosis: the PROGRESSA study. *JACC Cardiovasc Imaging* **2015**, *8* (1), 26-33.
502. Stafforini, D. M.; Satoh, K.; Atkinson, D. L.; Tjoelker, L. W.; Eberhardt, C.; Yoshida, H.; Imaizumi, T.; Takamatsu, S.; Zimmerman, G. A.; McIntyre, T. M.; Gray, P. W.; Prescott, S. M., Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. *J Clin Invest* **1996**, *97* (12), 2784-91.

503. Donato, L. J.; Meeusen, J. W.; Callanan, H.; Saenger, A. K.; Jaffe, A. S., Advantages of the lipoprotein-associated phospholipase A2 activity assay. *Clin Biochem* **2016**, *49* (1-2), 172-5.
504. Meschia, J. F.; Bushnell, C.; Boden-Albala, B.; Braun, L. T.; Bravata, D. M.; Chaturvedi, S.; Creager, M. A.; Eckel, R. H.; Elkind, M. S.; Fornage, M.; Goldstein, L. B.; Greenberg, S. M.; Horvath, S. E.; Iadecola, C.; Jauch, E. C.; Moore, W. S.; Wilson, J. A.; American Heart Association Stroke, C.; Council on, C.; Stroke, N.; Council on Clinical, C.; Council on Functional, G.; Translational, B.; Council on, H., Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **2014**, *45* (12), 3754-832.
505. Wallentin, L.; Held, C.; Armstrong, P. W.; Cannon, C. P.; Davies, R. Y.; Granger, C. B.; Hagstrom, E.; Harrington, R. A.; Hochman, J. S.; Koenig, W.; Krug-Gourley, S.; Mohler, E. R., 3rd; Siegbahn, A.; Tarka, E.; Steg, P. G.; Stewart, R. A.; Weiss, R.; Ostlund, O.; White, H. D.; Investigators, S., Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity Is a Marker of Risk But Not a Useful Target for Treatment in Patients With Stable Coronary Heart Disease. *J Am Heart Assoc* **2016**, *5* (6).
506. Chang, Q.; Zhang, F.; Xue, Q.; Song, A., Evaluation of ankle brachial index, serum miR-103 and LP-PLA2 in the prognosis of acute ischemic stroke. *Pak J Med Sci* **2024**, *40* (4), 763-766.
507. De Stefano, A.; Mannucci, L.; Massoud, R.; Bernardini, S.; Cortese, C., Performance characteristics of lipoprotein-associated phospholipase A2 activity assay on the Dimension Vista analyser and preliminary study of a healthy Italian population. *Biochem Med (Zagreb)* **2017**, *27* (3), 030701.
508. Adam, S. S.; Key, N. S.; Greenberg, C. S., D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood* **2009**, *113* (13), 2878-87.
509. Johnson, E. D.; Schell, J. C.; Rodgers, G. M., The D-dimer assay. *Am J Hematol* **2019**, *94* (7), 833-839.
510. Wells, P. S.; Owen, C.; Doucette, S.; Fergusson, D.; Tran, H., Does this patient have deep vein thrombosis? *JAMA* **2006**, *295* (2), 199-207.
511. Geersing, G. J.; Erkens, P. M.; Lucassen, W. A.; Buller, H. R.; Cate, H. T.; Hoes, A. W.; Moons, K. G.; Prins, M. H.; Oudega, R.; van Weert, H. C.; Stoffers, H. E., Safe exclusion of pulmonary embolism using the Wells rule and qualitative D-dimer testing in primary care: prospective cohort study. *BMJ* **2012**, *345*, e6564.
512. Wells, P. S.; Anderson, D. R.; Rodger, M.; Forgie, M.; Kearon, C.; Dreyer, J.; Kovacs, G.; Mitchell, M.; Lewandowski, B.; Kovacs, M. J., Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* **2003**, *349* (13), 1227-35.
513. Righini, M.; Goehring, C.; Bounameaux, H.; Perrier, A., Effects of age on the performance of common diagnostic tests for pulmonary embolism. *Am J Med* **2000**, *109* (5), 357-61.
514. Kearon, C., Diagnosis of suspected venous thromboembolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2016**, *2016* (1), 397-403.
515. Raja, A. S.; Greenberg, J. O.; Qaseem, A.; Denberg, T. D.; Fitterman, N.; Schuur, J. D.; Clinical Guidelines Committee of the American College of P., Evaluation of Patients With Suspected Acute Pulmonary Embolism: Best Practice Advice From the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. *Ann Intern Med* **2015**, *163* (9), 701-11.

516. Cohen, A. T.; Spiro, T. E.; Spyropoulos, A. C.; Desanctis, Y. H.; Homering, M.; Buller, H. R.; Haskell, L.; Hu, D.; Hull, R.; Mebazaa, A.; Merli, G.; Schellong, S.; Tapson, V. F.; Burton, P.; Group, M. S., D-dimer as a predictor of venous thromboembolism in acutely ill, hospitalized patients: a subanalysis of the randomized controlled MAGELLAN trial. *J Thromb Haemost* **2014**, *12* (4), 479-87.
517. Feinberg, W. M.; Erickson, L. P.; Bruck, D.; Kittelson, J., Hemostatic markers in acute ischemic stroke. Association with stroke type, severity, and outcome. *Stroke* **1996**, *27* (8), 1296-300.
518. Wen, D.; Du, X.; Dong, J. Z.; Zhou, X. L.; Ma, C. S., Value of D-dimer and C reactive protein in predicting inhospital death in acute aortic dissection. *Heart* **2013**, *99* (16), 1192-7.
519. Knowlson, L.; Bacchu, S.; Paneesha, S.; McManus, A.; Randall, K.; Rose, P., Elevated D-dimers are also a marker of underlying malignancy and increased mortality in the absence of venous thromboembolism. *J Clin Pathol* **2010**, *63* (9), 818-22.
520. Shlipak, M. G.; Fried, L. F.; Crump, C.; Bleyer, A. J.; Manolio, T. A.; Tracy, R. P.; Furberg, C. D.; Psaty, B. M., Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* **2003**, *107* (1), 87-92.
521. Lip, G. Y.; Lip, P. L.; Zarifis, J.; Watson, R. D.; Bareford, D.; Lowe, G. D.; Beevers, D. G., Fibrin D-dimer and beta-thromboglobulin as markers of thrombogenesis and platelet activation in atrial fibrillation. Effects of introducing ultra-low-dose warfarin and aspirin. *Circulation* **1996**, *94* (3), 425-31.
522. Zorlu, A.; Yilmaz, M. B.; Yucel, H.; Bektasoglu, G.; Refiker Ege, M.; Tandogan, I., Increased d-dimer levels predict cardiovascular mortality in patients with systolic heart failure. *J Thromb Thrombolysis* **2012**, *33* (4), 322-8.
523. Weitz, J. I.; Fredenburgh, J. C.; Eikelboom, J. W., A Test in Context: D-Dimer. *J Am Coll Cardiol* **2017**, *70* (19), 2411-2420.
524. Sasani, H.; Mutlu, L. C., Quantitative evaluation of computed tomography findings in patients with pulmonary embolism: the link between D-Dimer level and thrombus volume. *Rev Assoc Med Bras (1992)* **2021**, *67* (2), 218-223.
525. Huang, L.; Liang, L.; Tian, P.; Zhao, L.; Chen, Y.; Huang, Y.; Zhou, Q.; Zhai, M.; Zhang, Y.; Ambrosio, G.; Zhang, J., D-dimer and outcomes in hospitalized heart failure patients across the ejection fraction phenotypes. *ESC Heart Fail* **2022**, *9* (5), 3060-3070.
526. Semeraro, F.; Ammollo, C. T.; Caironi, P.; Masson, S.; Latini, R.; Panigada, M.; Pesenti, A.; Semeraro, N.; Gattinoni, L.; Colucci, M., D-dimer corrected for thrombin and plasmin generation is a strong predictor of mortality in patients with sepsis. *Blood Transfus* **2020**, *18* (4), 304-311.
527. Zhou, Q.; Xue, Y.; Shen, J.; Zhou, W.; Wen, Y.; Luo, S., Predictive values of D-dimer for the long-term prognosis of acute ST-segment elevation infarction: A retrospective study in southwestern China. *Medicine (Baltimore)* **2020**, *99* (16), e19724.
528. Longstaff, C.; Adcock, D.; Olson, J. D.; Jennings, I.; Kitchen, S.; Mutch, N.; Meijer, P.; Favaloro, E. J.; Lippi, G.; Thachil, J., Harmonisation of D-dimer - A call for action. *Thromb Res* **2016**, *137*, 219-220.
529. Schouten, H. J.; Geersing, G. J.; Koek, H. L.; Zuithoff, N. P.; Janssen, K. J.; Douma, R. A.; van Delden, J. J.; Moons, K. G.; Reitsma, J. B., Diagnostic accuracy of conventional or age adjusted D-dimer cut-off values in older patients with suspected venous thromboembolism: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **2013**, *346*, f2492.

530. Cesari, M.; Rossi, G. P.; Sticchi, D.; Pessina, A. C., Is homocysteine important as risk factor for coronary heart disease? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2005**, *15* (2), 140-7.
531. Hankey, G. J.; Eikelboom, J. W., Homocysteine and vascular disease. *Lancet* **1999**, *354* (9176), 407-13.
532. Curro, M.; Gugliandolo, A.; Gangemi, C.; Risitano, R.; Ientile, R.; Caccamo, D., Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. *Neurochem Res* **2014**, *39* (8), 1485-95.
533. Baszczuk, A.; Kopczynski, Z., [Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **2014**, *68*, 579-89.
534. Perla-Kajan, J.; Jakubowski, H., Dysregulation of Epigenetic Mechanisms of Gene Expression in the Pathologies of Hyperhomocysteinemia. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (13).
535. Lash, L. H.; Anders, M. W., Mechanism of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine- and S-(1,2-dichlorovinyl)-L-homocysteine-induced renal mitochondrial toxicity. *Mol Pharmacol* **1987**, *32* (4), 549-56.
536. Schaffer, A.; Verdoia, M.; Casetti, E.; Marino, P.; Suryapranata, H.; De Luca, G.; Novara Atherosclerosis Study, G., Relationship between homocysteine and coronary artery disease. Results from a large prospective cohort study. *Thromb Res* **2014**, *134* (2), 288-93.
537. Marcus, J.; Sarnak, M. J.; Menon, V., Homocysteine lowering and cardiovascular disease risk: lost in translation. *Can J Cardiol* **2007**, *23* (9), 707-10.
538. Smith, A. D.; Refsum, H., Homocysteine - from disease biomarker to disease prevention. *J Intern Med* **2021**, *290* (4), 826-854.
539. Marti-Carvajal, A. J.; Sola, I.; Lathyris, D.; Dayer, M., Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev* **2017**, *8* (8), CD006612.
540. Carter, C. E.; Katz, R.; Kramer, H.; de Boer, I. H.; Kestenbaum, B. R.; Peralta, C. A.; Siscovick, D.; Sarnak, M. J.; Levey, A. S.; Inker, L. A.; Allison, M. A.; Criqui, M. H.; Shlipak, M. G.; Ix, J. H., Influence of urine creatinine concentrations on the relation of albumin-creatinine ratio with cardiovascular disease events: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Kidney Dis* **2013**, *62* (4), 722-9.
541. Gerstein, H. C.; Mann, J. F.; Yi, Q.; Zinman, B.; Dinneen, S. F.; Hoogwerf, B.; Halle, J. P.; Young, J.; Rashkow, A.; Joyce, C.; Nawaz, S.; Yusuf, S.; Investigators, H. S., Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* **2001**, *286* (4), 421-6.
542. Hillege, H. L.; Fidler, V.; Diercks, G. F.; van Gilst, W. H.; de Zeeuw, D.; van Veldhuisen, D. J.; Gans, R. O.; Janssen, W. M.; Grobbee, D. E.; de Jong, P. E.; Prevention of, R.; Vascular End Stage Disease Study, G., Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation* **2002**, *106* (14), 1777-82.
543. Hemmelgarn, B. R.; Manns, B. J.; Lloyd, A.; James, M. T.; Klarenbach, S.; Quinn, R. R.; Wiebe, N.; Tonelli, M.; Alberta Kidney Disease, N., Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *JAMA* **2010**, *303* (5), 423-9.
544. Davies, M. J.; Hawkins, C. L., The Role of Myeloperoxidase in Biomolecule Modification, Chronic Inflammation, and Disease. *Antioxid Redox Signal* **2020**, *32* (13), 957-981.
545. Fiedler, T. J.; Davey, C. A.; Fenna, R. E., X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem* **2000**, *275* (16), 11964-71.

546. Baldus, S.; Heeschen, C.; Meinertz, T.; Zeiher, A. M.; Eiserich, J. P.; Munzel, T.; Simoons, M. L.; Hamm, C. W.; Investigators, C., Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **2003**, *108* (12), 1440-5.
547. Soubhye, J.; Aldib, I.; Delporte, C.; Prevost, M.; Dufrasne, F.; Antwerpen, P. V., Myeloperoxidase as a Target for the Treatment of Inflammatory Syndromes: Mechanisms and Structure Activity Relationships of Inhibitors. *Curr Med Chem* **2016**, *23* (35), 3975-4008.
548. Nicholls, S. J.; Hazen, S. L., Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *J Lipid Res* **2009**, *50 Suppl* (Suppl), S346-51.
549. Quintana, R. A.; Taylor, W. R., Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ Res* **2019**, *124* (4), 607-618.
550. Li, S. B.; Yang, F.; Jing, L.; Ma, J.; Jia, Y. D.; Dong, S. Y.; Zheng, W. F.; Zhao, L. S., Myeloperoxidase and risk of recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation. *J Investig Med* **2013**, *61* (4), 722-7.
551. Soubhye, J.; Van Antwerpen, P.; Dufrasne, F., A patent review of myeloperoxidase inhibitors for treating chronic inflammatory syndromes (focus on cardiovascular diseases, 2013-2019). *Expert Opin Ther Pat* **2020**, *30* (8), 595-608.
552. Li, J.; Cao, T.; Wei, Y.; Zhang, N.; Zhou, Z.; Wang, Z.; Li, J.; Zhang, Y.; Wang, S.; Wang, P.; Cheng, N.; Ye, L.; Li, M.; Yu, Y.; Ding, C.; Tan, Z.; Zhan, B.; He, Q.; Bao, H.; Wu, Y.; Liu, L.; Li, J.; Xu, X.; Cheng, X.; Huang, X., A Review of Novel Cardiac Biomarkers in Acute or Chronic Cardiovascular Diseases: The Role of Soluble ST2 (sST2), Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2), Myeloperoxidase (MPO), and Procalcitonin (PCT). *Dis Markers* **2021**, *2021*, 6258865.
553. Oemrawsingh, R. M.; Lenderink, T.; Akkerhuis, K. M.; Heeschen, C.; Baldus, S.; Fichtlscherer, S.; Hamm, C. W.; Simoons, M. L.; Boersma, E.; investigators, C., Multimarker risk model containing troponin-T, interleukin 10, myeloperoxidase and placental growth factor predicts long-term cardiovascular risk after non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Heart* **2011**, *97* (13), 1061-6.
554. Brevetti, G.; Schiano, V.; Laurenzano, E.; Giugliano, G.; Petretta, M.; Scopacasa, F.; Chiariello, M., Myeloperoxidase, but not C-reactive protein, predicts cardiovascular risk in peripheral arterial disease. *Eur Heart J* **2008**, *29* (2), 224-30.
555. Trentini, A.; Rosta, V.; Spadaro, S.; Bellini, T.; Rizzo, P.; Vieceli Dalla Sega, F.; Passaro, A.; Zuliani, G.; Gentili, V.; Campo, G.; Cervellati, C., Development, optimization and validation of an absolute specific assay for active myeloperoxidase (MPO) and its application in a clinical context: role of MPO specific activity in coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med* **2020**, *58* (10), 1749-1758.
556. Goiffon, R. J.; Martinez, S. C.; Piwnica-Worms, D., A rapid bioluminescence assay for measuring myeloperoxidase activity in human plasma. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6271.
557. Ridker, P. M.; Rane, M., Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circ Res* **2021**, *128* (11), 1728-1746.
558. Libby, P., Targeting Inflammatory Pathways in Cardiovascular Disease: The Inflammasome, Interleukin-1, Interleukin-6 and Beyond. *Cells* **2021**, *10* (4).
559. Zhang, B.; Li, X. L.; Zhao, C. R.; Pan, C. L.; Zhang, Z., Interleukin-6 as a Predictor of the Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Prospective Epidemiological Studies. *Immunol Invest* **2018**, *47* (7), 689-699.
560. Batra, G.; Ghukasyan Lakic, T.; Lindback, J.; Held, C.; White, H. D.; Stewart, R. A. H.; Koenig, W.; Cannon, C. P.; Budaj, A.; Hagstrom, E.; Siegbahn, A.; Wallentin, L.;

- Investigators, S., Interleukin 6 and Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease and Chronic Coronary Syndrome. *JAMA Cardiol* **2021**, *6* (12), 1440-1445.
561. Vasques-Novoa, F.; Pedro Ferreira, J.; Marques, P.; Sergio Neves, J.; Vale, C.; Ribeirinho-Soares, P.; Marques, J.; Martins, S.; Tiago Guimaraes, J.; Barros, A. S.; Leite-Moreira, A. F.; Roncon-Albuquerque, R.; Almeida, J.; Bettencourt, P.; Frioies, F., Interleukin-6, infection and cardiovascular outcomes in acute heart failure: Findings from the EDIFICA registry. *Cytokine* **2022**, *160*, 156053.
562. Abeywardena, M. Y.; Leifert, W. R.; Warnes, K. E.; Varghese, J. N.; Head, R. J., Cardiovascular biology of interleukin-6. *Curr Pharm Des* **2009**, *15* (15), 1809-21.
563. Calabrese, L. H.; Rose-John, S., IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* **2014**, *10* (12), 720-7.
564. Schaper, F.; Rose-John, S., Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev* **2015**, *26* (5), 475-87.
565. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T., IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2014**, *6* (10), a016295.
566. Ye, Z.; Dong, N.; Liang, K.; Hu, H.; Xu, J., Analytical and clinical evaluation of a novel assay for measurement of interleukin 6 in human whole blood samples. *J Clin Lab Anal* **2021**, *35* (11), e24011.
567. Pak, V. M.; Grandner, M. A.; Pack, A. I., Circulating adhesion molecules in obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Sleep Med Rev* **2014**, *18* (1), 25-34.
568. Ridker, P. M.; Hennekens, C. H.; Roitman-Johnson, B.; Stampfer, M. J.; Allen, J., Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* **1998**, *351* (9096), 88-92.
569. Galkina, E.; Ley, K., Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007**, *27* (11), 2292-301.
570. Kong, D. H.; Kim, Y. K.; Kim, M. R.; Jang, J. H.; Lee, S., Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (4).
571. Turhan, H.; Saydam, G. S.; Erbay, A. R.; Ayaz, S.; Yasar, A. S.; Aksoy, Y.; Basar, N.; Yetkin, E., Increased plasma soluble adhesion molecules; ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin levels in patients with slow coronary flow. *Int J Cardiol* **2006**, *108* (2), 224-30.
572. Lang, P. P.; Bai, J.; Zhang, Y. L.; Yang, X. L.; Xia, Y. L.; Lin, Q. Y.; Li, H. H., Blockade of intercellular adhesion molecule-1 prevents angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Lab Invest* **2020**, *100* (3), 378-386.
573. Staunton, D. E.; Marlin, S. D.; Stratowa, C.; Dustin, M. L.; Springer, T. A., Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **1988**, *52* (6), 925-33.
574. Cook-Mills, J. M.; Marchese, M. E.; Abdala-Valencia, H., Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal* **2011**, *15* (6), 1607-38.
575. Jubeli, E.; Moine, L.; Vergnaud-Gauduchon, J.; Barratt, G., E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. *J Control Release* **2012**, *158* (2), 194-206.
576. Merten, M.; Thiagarajan, P., P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol* **2004**, *93* (11), 855-63.
577. Cushing, S. D.; Berliner, J. A.; Valente, A. J.; Territo, M. C.; Navab, M.; Parhami, F.; Gerrity, R.; Schwartz, C. J.; Fogelman, A. M., Minimally modified low density lipoprotein

induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87* (13), 5134-8.

578. Cipollone, F.; Marini, M.; Fazio, M.; Pini, B.; Iezzi, A.; Reale, M.; Paloscia, L.; Materazzo, G.; D'Annunzio, E.; Conti, P.; Chiarelli, F.; Cuccurullo, F.; Mezzetti, A., Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2001**, *21* (3), 327-34.

579. Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B. E., Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* **2009**, *29* (6), 313-26.

580. Egashira, K., Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension* **2003**, *41* (3 Pt 2), 834-41.

581. Lutgens, E.; Faber, B.; Schapira, K.; Evelo, C. T.; van Haften, R.; Heeneman, S.; Cleutjens, K. B.; Bijmens, A. P.; Beckers, L.; Porter, J. G.; Mackay, C. R.; Rennert, P.; Bailly, V.; Jarpe, M.; Dolinski, B.; Kotliansky, V.; de Fougerolles, T.; Daemen, M. J., Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody. *Circulation* **2005**, *111* (25), 3443-52.

582. Miao, M.; De Clercq, E.; Li, G., Clinical significance of chemokine receptor antagonists. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2020**, *16* (1), 11-30.

583. Mann, D. L., Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart. *Heart Fail Rev* **2001**, *6* (2), 71-80.

584. Barath, P.; Fishbein, M. C.; Cao, J.; Berenson, J.; Helfant, R. H.; Forrester, J. S., Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol* **1990**, *65* (5), 297-302.

585. Zhang, H.; Dhalla, N. S., The Role of Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci* **2024**, *25* (2).

586. Kalinskaya, A.; Dukhin, O.; Lebedeva, A.; Maryukhnich, E.; Rusakovich, G.; Vorobyeva, D.; Shpektor, A.; Margolis, L.; Vasilieva, E., Circulating Cytokines in Myocardial Infarction Are Associated With Coronary Blood Flow. *Front Immunol* **2022**, *13*, 837642.

587. Ait-Oufella, H.; Libby, P.; Tedgui, A., Anticytokine Immune Therapy and Atherothrombotic Cardiovascular Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2019**, *39* (8), 1510-1519.

588. Horiuchi, T.; Mitoma, H.; Harashima, S.; Tsukamoto, H.; Shimoda, T., Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* **2010**, *49* (7), 1215-28.

589. Liu, P.; Sun, M.; Sader, S., Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* **2006**, *22 Suppl B* (Suppl B), 25B-30B.

590. Peeters, S. A.; Engelen, L.; Buijs, J.; Jorsal, A.; Parving, H. H.; Tarnow, L.; Rossing, P.; Schalkwijk, C. G.; Stehouwer, C. D. A., Plasma matrix metalloproteinases are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in patients with type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. *Cardiovasc Diabetol* **2017**, *16* (1), 55.

591. Briasoulis, A.; Tousoulis, D.; Papageorgiou, N.; Kampoli, A. M.; Androulakis, E.; Antoniadis, C.; Tsiamis, E.; Latsios, G.; Stefanadis, C., Novel therapeutic approaches targeting matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem* **2012**, *12* (10), 1214-21.

592. Castro, M. M.; Tanus-Santos, J. E., Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. *Curr Drug Targets* **2013**, *14* (3), 335-43.
593. Erman, H.; Gelisgen, R.; Cengiz, M.; Tabak, O.; Erdenen, F.; Uzun, H., The association of vascular endothelial growth factor, metalloproteinases and their tissue inhibitors with cardiovascular risk factors in the metabolic syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2016**, *20* (6), 1015-22.
594. Gunasinghe, S. K.; Ikonomidis, J.; Spinale, F. G., Contributory role of matrix metalloproteinases in cardiovascular remodeling. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **2001**, *1* (2), 75-91.
595. Tajhya, R. B.; Patel, R. S.; Beeton, C., Detection of Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Methods Mol Biol* **2017**, *1579*, 231-244.
596. Cui, N.; Hu, M.; Khalil, R. A., Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2017**, *147*, 1-73.
597. Schafer, M.; Ivy, D. D.; Nguyen, K.; Boncella, K.; Frank, B. S.; Morgan, G. J.; Miller-Reed, K.; Truong, U.; Colvin, K.; Yeager, M. E., Metalloproteinases and their inhibitors are associated with pulmonary arterial stiffness and ventricular function in pediatric pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2021**, *321* (1), H242-H252.
598. Raeeszadeh-Sarmazdeh, M.; Do, L. D.; Hritz, B. G., Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells* **2020**, *9* (5).
599. Jackson, H. W.; Defamie, V.; Waterhouse, P.; Khokha, R., TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nat Rev Cancer* **2017**, *17* (1), 38-53.
600. Gragnano, F.; Golia, E.; Natale, F.; Bianchi, R.; Pariggiano, I.; Crisci, M.; Diana, V.; Fimiani, F.; Limongelli, G.; Russo, M.; Cirillo, P.; Calabro, P., Von Willebrand Factor and Cardiovascular Disease: From a Biochemical Marker to an Attractive Therapeutic Target. *Curr Vasc Pharmacol* **2017**, *15* (5), 404-415.
601. Terraube, V.; O'Donnell, J. S.; Jenkins, P. V., Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* **2010**, *16* (1), 3-13.
602. Kawecki, C.; Lenting, P. J.; Denis, C. V., von Willebrand factor and inflammation. *J Thromb Haemost* **2017**, *15* (7), 1285-1294.
603. Springer, T. A., von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood* **2014**, *124* (9), 1412-25.
604. Budde, U.; Schneppenheim, R., Von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Rev Clin Exp Hematol* **2001**, *5* (4), 335-68; quiz following 431.
605. Okhota, S.; Melnikov, I.; Avtaeva, Y.; Kozlov, S.; Gabbasov, Z., Shear Stress-Induced Activation of von Willebrand Factor and Cardiovascular Pathology. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (20).
606. Witsch, T.; Martinod, K.; Sorvillo, N.; Portier, I.; De Meyer, S. F.; Wagner, D. D., Recombinant Human ADAMTS13 Treatment Improves Myocardial Remodeling and Functionality After Pressure Overload Injury in Mice. *J Am Heart Assoc* **2018**, *7* (3).
607. Fan, M.; Wang, X.; Peng, X.; Feng, S.; Zhao, J.; Liao, L.; Zhang, Y.; Hou, Y.; Liu, J., Prognostic value of plasma von Willebrand factor levels in major adverse cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord* **2020**, *20* (1), 72.
608. Torres, R.; Fedoriw, Y., Laboratory testing for von Willebrand disease: toward a mechanism-based classification. *Clin Lab Med* **2009**, *29* (2), 193-228.

609. Doetschman, T.; Barnett, J. V.; Runyan, R. B.; Camenisch, T. D.; Heimark, R. L.; Granzier, H. L.; Conway, S. J.; Azhar, M., Transforming growth factor beta signaling in adult cardiovascular diseases and repair. *Cell Tissue Res* **2012**, *347* (1), 203-23.
610. Dabek, J.; Kulach, A.; Monastyrska-Cup, B.; Gasior, Z., Transforming growth factor beta and cardiovascular diseases: the other facet of the 'protective cytokine'. *Pharmacol Rep* **2006**, *58* (6), 799-805.
611. Agrotis, A.; Kalinina, N.; Bobik, A., Transforming growth factor-beta, cell signaling and cardiovascular disorders. *Curr Vasc Pharmacol* **2005**, *3* (1), 55-61.
612. Ma, S.; Ma, C. C., Recent development in pleiotropic effects of statins on cardiovascular disease through regulation of transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* **2011**, *22* (3), 167-75.
613. Lutgens, E.; Gijbels, M.; Smook, M.; Heeringa, P.; Gotwals, P.; Koteliensky, V. E.; Daemen, M. J., Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2002**, *22* (6), 975-82.
614. Grainger, D. J., Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2004**, *24* (3), 399-404.
615. Li, J.; Yang, L.; Qin, W.; Zhang, G.; Yuan, J.; Wang, F., Adaptive induction of growth differentiation factor 15 attenuates endothelial cell apoptosis in response to high glucose stimulus. *PLoS One* **2013**, *8* (6), e65549.
616. Bonaca, M. P.; Morrow, D. A.; Braunwald, E.; Cannon, C. P.; Jiang, S.; Breher, S.; Sabatine, M. S.; Kempf, T.; Wallentin, L.; Wollert, K. C., Growth differentiation factor-15 and risk of recurrent events in patients stabilized after acute coronary syndrome: observations from PROVE IT-TIMI 22. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**, *31* (1), 203-10.
617. Liu, H.; Lyu, Y. N.; Li, D.; Cui, Y.; Dai, W.; Li, Y., Association of circulating growth differentiation factor-15, Kruppel-like factor 4 and growth arrest-specific 6 with coronary artery disease. *Clin Chim Acta* **2019**, *495*, 630-636.
618. Xue, H.; Fu, Z.; Chen, Y.; Xing, Y.; Liu, J.; Zhu, H.; Zhou, X., The association of growth differentiation factor-15 with left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *PLoS One* **2012**, *7* (10), e46534.
619. Eddy, A. C.; Trask, A. J., Growth differentiation factor-15 and its role in diabetes and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **2021**, *57*, 11-18.
620. Bootcov, M. R.; Bauskin, A. R.; Valenzuela, S. M.; Moore, A. G.; Bansal, M.; He, X. Y.; Zhang, H. P.; Donnellan, M.; Mahler, S.; Pryor, K.; Walsh, B. J.; Nicholson, R. C.; Fairlie, W. D.; Por, S. B.; Robbins, J. M.; Breit, S. N., MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (21), 11514-9.
621. Welsh, J. B.; Sapinoso, L. M.; Kern, S. G.; Brown, D. A.; Liu, T.; Bauskin, A. R.; Ward, R. L.; Hawkins, N. J.; Quinn, D. I.; Russell, P. J.; Sutherland, R. L.; Breit, S. N.; Moskaluk, C. A.; Frierson, H. F., Jr.; Hampton, G. M., Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (6), 3410-5.
622. Wesseling, M.; de Poel, J. H. C.; de Jager, S. C. A., Growth differentiation factor 15 in adverse cardiac remodelling: from biomarker to causal player. *ESC Heart Fail* **2020**, *7* (4), 1488-1501.

623. Zhang, S.; Dai, D.; Wang, X.; Zhu, H.; Jin, H.; Zhao, R.; Jiang, L.; Lu, Q.; Yi, F.; Wan, X.; Cui, H., Growth differentiation factor-15 predicts the prognoses of patients with acute coronary syndrome: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord* **2016**, *16*, 82.
624. Adela, R.; Banerjee, S. K., GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *J Diabetes Res* **2015**, *2015*, 490842.
625. Kido, T.; Sawamura, T.; Hoshikawa, H.; D'Orleans-Juste, P.; Denault, J. B.; Leduc, R.; Kimura, J.; Masaki, T., Processing of proendothelin-1 at the C-terminus of big endothelin-1 is essential for proteolysis by endothelin-converting enzyme-1 in vivo. *Eur J Biochem* **1997**, *244* (2), 520-6.
626. Motte, S.; McEntee, K.; Naeije, R., Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther* **2006**, *110* (3), 386-414.
627. Leurgans, T. M.; Bloksgaard, M.; Brewer, J. R.; Bagatolli, L. A.; Fredgart, M. H.; Rosenstand, K.; Hansen, M. L.; Rasmussen, L. M.; Irmukhamedov, A.; De Mey, J. G., Endothelin-1 shifts the mediator of bradykinin-induced relaxation from NO to H₂O₂ in resistance arteries from patients with cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* **2016**, *173* (10), 1653-64.
628. Stewart, D. J.; Kubac, G.; Costello, K. B.; Cernacek, P., Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **1991**, *18* (1), 38-43.
629. Ogawa, Y.; Nakao, K.; Arai, H.; Nakagawa, O.; Hosoda, K.; Suga, S.; Nakanishi, S.; Imura, H., Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, *178* (1), 248-55.
630. Boivin, B.; Chevalier, D.; Villeneuve, L. R.; Rousseau, E.; Allen, B. G., Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem* **2003**, *278* (31), 29153-63.
631. Stewart, D. J.; Levy, R. D.; Cernacek, P.; Langleben, D., Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* **1991**, *114* (6), 464-9.
632. Tsutamato, T.; Wada, A.; Maeda, K.; Mabuchi, N.; Hayashi, M.; Tsutsui, T.; Ohnishi, M.; Sawaki, M.; Fujii, M.; Matsumoto, T.; Horie, H.; Sugimoto, Y.; Kinoshita, M., Transcardiac extraction of circulating endothelin-1 across the failing heart. *Am J Cardiol* **2000**, *86* (5), 524-8.
633. Houde, M.; Desbiens, L.; D'Orleans-Juste, P., Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol* **2016**, *77*, 143-75.
634. Pacher, R.; Stanek, B.; Hulsmann, M.; Koller-Strametz, J.; Berger, R.; Schuller, M.; Hartter, E.; Ogris, E.; Frey, B.; Heinz, G.; Maurer, G., Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* **1996**, *27* (3), 633-41.
635. Barton, M., Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin. *Nat Clin Pract Nephrol* **2008**, *4* (9), 490-501.
636. Cyr, A. R.; Huckaby, L. V.; Shiva, S. S.; Zuckerbraun, B. S., Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin* **2020**, *36* (2), 307-321.
637. Ignarro, L. J.; Harbison, R. G.; Wood, K. S.; Kadowitz, P. J., Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* **1986**, *237* (3), 893-900.

638. Lara, J.; Ashor, A. W.; Oggioni, C.; Ahluwalia, A.; Mathers, J. C.; Siervo, M., Effects of inorganic nitrate and beetroot supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr* **2016**, *55* (2), 451-459.
639. Roy, R.; Wilcox, J.; Webb, A. J.; O'Gallagher, K., Dysfunctional and Dysregulated Nitric Oxide Synthases in Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (20).
640. Thijssen, D. H.; Black, M. A.; Pyke, K. E.; Padilla, J.; Atkinson, G.; Harris, R. A.; Parker, B.; Widlansky, M. E.; Tschakovsky, M. E.; Green, D. J., Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2011**, *300* (1), H2-12.
641. Cui, J.; Hu, K.; Sun, J. J.; Qu, L. L.; Li, D. W., SERS nanoprobe for the monitoring of endogenous nitric oxide in living cells. *Biosens Bioelectron* **2016**, *85*, 324-330.
642. Takarada, S.; Imanishi, T.; Goto, M.; Mochizuki, S.; Ikejima, H.; Tsujioka, H.; Kuroi, A.; Takeshita, T.; Akasaka, T., First evaluation of real-time nitric oxide changes in the coronary circulation in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy using a catheter-type sensor. *Eur Heart J* **2010**, *31* (23), 2862-70.
643. Bryan, N. S.; Grisham, M. B., Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* **2007**, *43* (5), 645-57.
644. Murphy, M. E.; Noack, E., Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods Enzymol* **1994**, *233*, 240-50.
645. Ciszewski, A.; Milczarek, G., Electrochemical detection of nitric oxide using polymer modified electrodes. *Talanta* **2003**, *61* (1), 11-26.
646. Goshi, E.; Zhou, G.; He, Q., Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. *Med Gas Res* **2019**, *9* (4), 192-207.
647. Ma, T.; Zhang, Z.; Chen, Y.; Su, H.; Deng, X.; Liu, X.; Fan, Y., Delivery of Nitric Oxide in the Cardiovascular System: Implications for Clinical Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (22).
648. Tofler, G. H.; Massaro, J.; O'Donnell, C. J.; Wilson, P. W. F.; Vasan, R. S.; Sutherland, P. A.; Meigs, J. B.; Levy, D.; D'Agostino, R. B., Sr., Plasminogen activator inhibitor and the risk of cardiovascular disease: The Framingham Heart Study. *Thromb Res* **2016**, *140*, 30-35.
649. Ridker, P. M.; Brown, N. J.; Vaughan, D. E.; Harrison, D. G.; Mehta, J. L., Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* **2004**, *109* (25 Suppl 1), IV6-19.
650. Juhan-Vague, I.; Morange, P. E.; Alessi, M. C., The insulin resistance syndrome: implications for thrombosis and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* **2002**, *32* (5-6), 269-73.
651. Feinbloom, D.; Bauer, K. A., Assessment of hemostatic risk factors in predicting arterial thrombotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**, *25* (10), 2043-53.
652. Andreasen, P. A.; Riccio, A.; Welinder, K. G.; Douglas, R.; Sartorio, R.; Nielsen, L. S.; Oppenheimer, C.; Blasi, F.; Dano, K., Plasminogen activator inhibitor type-1: reactive center and amino-terminal heterogeneity determined by protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett* **1986**, *209* (2), 213-8.
653. Meltzer, M. E.; Lisman, T.; de Groot, P. G.; Meijers, J. C.; le Cessie, S.; Doggen, C. J.; Rosendaal, F. R., Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood* **2010**, *116* (1), 113-21.

654. Kang, S.; Tanaka, T.; Inoue, H.; Ono, C.; Hashimoto, S.; Kioi, Y.; Matsumoto, H.; Matsuura, H.; Matsubara, T.; Shimizu, K.; Ogura, H.; Matsuura, Y.; Kishimoto, T., IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2020**, *117* (36), 22351-22356.
655. Malgorzewicz, S.; Skrzypczak-Jankun, E.; Jankun, J., Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (Review). *Int J Mol Med* **2013**, *31* (3), 503-10.
656. Sillen, M.; Declerck, P. J., A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target? *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (5).
657. Breitenstein, A.; Tanner, F. C.; Luscher, T. F., Tissue factor and cardiovascular disease: quo vadis? *Circ J* **2010**, *74* (1), 3-12.
658. Holy, E. W.; Tanner, F. C., Tissue factor in cardiovascular disease pathophysiology and pharmacological intervention. *Adv Pharmacol* **2010**, *59*, 259-92.
659. Wang, J.; Ciaraldi, T. P.; Samad, F., Tissue factor expression in obese type 2 diabetic subjects and its regulation by antidiabetic agents. *J Obes* **2015**, *2015*, 291209.
660. Buchs, A. E.; Kornberg, A.; Zahavi, M.; Aharoni, D.; Zarfati, C.; Rapoport, M. J., Increased expression of tissue factor and receptor for advanced glycation end products in peripheral blood mononuclear cells of patients with type 2 diabetes mellitus with vascular complications. *Exp Diabetes Res* **2004**, *5* (2), 163-9.
661. Pieters, M.; Wolberg, A. S., Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost* **2019**, *3* (2), 161-172.
662. Vilar, R.; Fish, R. J.; Casini, A.; Neerman-Arbez, M., Fibrin(ogen) in human disease: both friend and foe. *Haematologica* **2020**, *105* (2), 284-296.
663. Kryczka, K. E.; Kruk, M.; Demkow, M.; Lubiszewska, B., Fibrinogen and a Triad of Thrombosis, Inflammation, and the Renin-Angiotensin System in Premature Coronary Artery Disease in Women: A New Insight into Sex-Related Differences in the Pathogenesis of the Disease. *Biomolecules* **2021**, *11* (7).
664. Surma, S.; Banach, M., Fibrinogen and Atherosclerotic Cardiovascular Diseases-Review of the Literature and Clinical Studies. *Int J Mol Sci* **2021**, *23* (1).
665. Stang, L. J.; Mitchell, L. G., Fibrinogen. *Methods Mol Biol* **2013**, *992*, 181-92.
666. Lowe, G. D.; Rumley, A.; Mackie, I. J., Plasma fibrinogen. *Ann Clin Biochem* **2004**, *41* (Pt 6), 430-40.
667. Lopez, B.; Gonzalez, A.; Ravassa, S.; Beaumont, J.; Moreno, M. U.; San Jose, G.; Querejeta, R.; Diez, J., Circulating Biomarkers of Myocardial Fibrosis: The Need for a Reappraisal. *J Am Coll Cardiol* **2015**, *65* (22), 2449-56.
668. Pauschinger, M.; Knopf, D.; Petschauer, S.; Doerner, A.; Poller, W.; Schwimmbeck, P. L.; Kuhl, U.; Schultheiss, H. P., Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* **1999**, *99* (21), 2750-6.
669. Querejeta, R.; Varo, N.; Lopez, B.; Larman, M.; Artinano, E.; Etayo, J. C.; Martinez Ubago, J. L.; Gutierrez-Stampa, M.; Emparanza, J. I.; Gil, M. J.; Monreal, I.; Mindan, J. P.; Diez, J., Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation* **2000**, *101* (14), 1729-35.
670. Ferreira, J. P.; Collier, T.; Clark, A. L.; Mamas, M. A.; Rocca, H. B.; Heymans, S.; Gonzalez, A.; Ahmed, F. Z.; Petutschnigg, J.; Mujaj, B.; Cuthbert, J.; Rouet, P.; Pellicori, P.; Mariottoni, B.; Cosmi, F.; Edelmann, F.; Thijs, L.; Staessen, J. A.; Hazebroek, M.; Verdonschot, J.; Rossignol, P.; Girerd, N.; Cleland, J. G.; Zannad, F., Spironolactone effect on the blood pressure of patients at risk of developing heart failure: an analysis from the HOMAGE trial. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother* **2022**, *8* (2), 149-156.

671. Raafs, A. G.; Verdonschot, J. A. J.; Henkens, M.; Adriaans, B. P.; Wang, P.; Derks, K.; Abdul Hamid, M. A.; Knackstedt, C.; van Empel, V. P. M.; Diez, J.; Brunner-La Rocca, H. P.; Brunner, H. G.; Gonzalez, A.; Bekkers, S.; Heymans, S. R. B.; Hazebroek, M. R., The combination of carboxy-terminal propeptide of procollagen type I blood levels and late gadolinium enhancement at cardiac magnetic resonance provides additional prognostic information in idiopathic dilated cardiomyopathy - A multilevel assessment of myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* **2021**, *23* (6), 933-944.
672. Ferreira, J. P.; Cleland, J. G.; Girerd, N.; Rossignol, P.; Pellicori, P.; Cosmi, F.; Mariotoni, B.; Gonzalez, A.; Diez, J.; Solomon, S. D.; Claggett, B.; Pfeffer, M. A.; Pitt, B.; Petutschnigg, J.; Pieske, B.; Edelmann, F.; Zannad, F., Spironolactone effect on circulating procollagen type I carboxy-terminal propeptide: Pooled analysis of three randomized trials. *Int J Cardiol* **2023**, *377*, 86-88.
673. Ravassa, S.; Ballesteros, G.; Lopez, B.; Ramos, P.; Bragard, J.; Gonzalez, A.; Moreno, M. U.; Querejeta, R.; Vives, E.; Garcia-Bolao, I.; Diez, J., Combination of Circulating Type I Collagen-Related Biomarkers Is Associated With Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol* **2019**, *73* (12), 1398-1410.
674. Satta, J.; Juvonen, T.; Haukipuro, K.; Juvonen, M.; Kairaluoma, M. I., Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples. *J Vasc Surg* **1995**, *22* (2), 155-60.
675. Kosmala, W.; Przewlocka-Kosmala, M.; Szczepanik-Osadnik, H.; Mysiak, A.; O'Moore-Sullivan, T.; Marwick, T. H., A randomized study of the beneficial effects of aldosterone antagonism on LV function, structure, and fibrosis markers in metabolic syndrome. *JACC Cardiovasc Imaging* **2011**, *4* (12), 1239-49.
676. Lin, Y. H.; Ho, Y. L.; Wang, T. D.; Liu, C. P.; Kao, H. L.; Chao, C. L.; Chien, K. L.; Hung, C. S.; Wu, V. C.; Tsai, I. J.; Yen, R. F.; Shiau, Y. C.; Chen, W. J., The relation of amino-terminal propeptide of type III procollagen and severity of coronary artery disease in patients without myocardial infarction or hibernation. *Clin Biochem* **2006**, *39* (9), 861-6.
677. Scisciola, L.; Paolisso, P.; Belmonte, M.; Gallinoro, E.; Delrue, L.; Taktaz, F.; Fontanella, R. A.; Degrieck, I.; Pesapane, A.; Casselman, F.; Puocci, A.; Franzese, M.; Van Praet, F.; Torella, M.; Marfella, R.; De Feo, M.; Bartunek, J.; Paolisso, G.; Barbato, E.; Barbieri, M.; Vanderheyden, M., Myocardial sodium-glucose cotransporter 2 expression and cardiac remodelling in patients with severe aortic stenosis: The BIO-AS study. *Eur J Heart Fail* **2024**, *26* (2), 471-482.
678. Banerjee, T.; Mukherjee, S.; Ghosh, S.; Biswas, M.; Dutta, S.; Pattari, S.; Chatterjee, S.; Bandyopadhyay, A., Clinical significance of markers of collagen metabolism in rheumatic mitral valve disease. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e90527.
679. Martos, R.; Baugh, J.; Ledwidge, M.; O'Loughlin, C.; Conlon, C.; Patle, A.; Donnelly, S. C.; McDonald, K., Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation* **2007**, *115* (7), 888-95.
680. Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **1994**, *372* (6505), 425-32.
681. Dallongeville, J.; Fruchart, J. C.; Auwerx, J., Leptin, a pleiotropic hormone: physiology, pharmacology, and strategies for discovery of leptin modulators. *J Med Chem* **1998**, *41* (27), 5337-52.

682. Francisco, V.; Pino, J.; Campos-Cabaleiro, V.; Ruiz-Fernandez, C.; Mera, A.; Gonzalez-Gay, M. A.; Gomez, R.; Gualillo, O., Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Front Physiol* **2018**, *9*, 640.
683. Al-Suhaimi, E. A.; Shehzad, A., Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur J Med Res* **2013**, *18* (1), 12.
684. Mittendorfer, B.; Horowitz, J. F.; DePaoli, A. M.; McCamish, M. A.; Patterson, B. W.; Klein, S., Recombinant human leptin treatment does not improve insulin action in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* **2011**, *60* (5), 1474-7.
685. Tsai, J. P.; Wang, J. H.; Chen, M. L.; Yang, C. F.; Chen, Y. C.; Hsu, B. G., Association of serum leptin levels with central arterial stiffness in coronary artery disease patients. *BMC Cardiovasc Disord* **2016**, *16*, 80.
686. Aizawa-Abe, M.; Ogawa, Y.; Masuzaki, H.; Ebihara, K.; Satoh, N.; Iwai, H.; Matsuoka, N.; Hayashi, T.; Hosoda, K.; Inoue, G.; Yoshimasa, Y.; Nakao, K., Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* **2000**, *105* (9), 1243-52.
687. Zhao, S.; Zhu, Y.; Schultz, R. D.; Li, N.; He, Z.; Zhang, Z.; Caron, A.; Zhu, Q.; Sun, K.; Xiong, W.; Deng, H.; Sun, J.; Deng, Y.; Kim, M.; Lee, C. E.; Gordillo, R.; Liu, T.; Odle, A. K.; Childs, G. V.; Zhang, N.; Kusminski, C. M.; Elmquist, J. K.; Williams, K. W.; An, Z.; Scherer, P. E., Partial Leptin Reduction as an Insulin Sensitization and Weight Loss Strategy. *Cell Metab* **2019**, *30* (4), 706-719 e6.
688. Blum, W. F.; Englaro, P.; Hanitsch, S.; Juul, A.; Hertel, N. T.; Muller, J.; Skakkebaek, N. E.; Heiman, M. L.; Birkett, M.; Attanasio, A. M.; Kiess, W.; Rascher, W., Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* **1997**, *82* (9), 2904-10.
689. Scherer, P. E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G.; Lodish, H. F., A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* **1995**, *270* (45), 26746-9.
690. Silha, J. V.; Krsek, M.; Skrha, J. V.; Sucharda, P.; Nyomba, B. L.; Murphy, L. J., Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol* **2003**, *149* (4), 331-5.
691. Marangoni, R. G.; Masui, Y.; Fang, F.; Korman, B.; Lord, G.; Lee, J.; Lakota, K.; Wei, J.; Scherer, P. E.; Otvos, L.; Yamauchi, T.; Kubota, N.; Kadowaki, T.; Asano, Y.; Sato, S.; Tourtellotte, W. G.; Varga, J., Adiponectin is an endogenous anti-fibrotic mediator and therapeutic target. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 4397.
692. Kobayashi, H.; Ouchi, N.; Kihara, S.; Walsh, K.; Kumada, M.; Abe, Y.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y., Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* **2004**, *94* (4), e27-31.
693. Pajvani, U. B.; Du, X.; Combs, T. P.; Berg, A. H.; Rajala, M. W.; Schulthess, T.; Engel, J.; Brownlee, M.; Scherer, P. E., Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* **2003**, *278* (11), 9073-85.
694. Khan, R. S.; Kato, T. S.; Chokshi, A.; Chew, M.; Yu, S.; Wu, C.; Singh, P.; Cheema, F. H.; Takayama, H.; Harris, C.; Reyes-Soffer, G.; Knoll, R.; Milting, H.; Naka, Y.; Mancini, D.; Schulze, P. C., Adipose tissue inflammation and adiponectin resistance in patients with advanced heart failure: correction after ventricular assist device implantation. *Circ Heart Fail* **2012**, *5* (3), 340-8.

695. Allison, M. A.; Bluemke, D. A.; McClelland, R.; Cushman, M.; Criqui, M. H.; Polak, J. F.; Lima, J. A., Relation of leptin to left ventricular hypertrophy (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *Am J Cardiol* **2013**, *112* (5), 726-30.
696. Zhao, S.; Kusminski, C. M.; Scherer, P. E., Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. *Circ Res* **2021**, *128* (1), 136-149.
697. Holwerda, D. A., A glycopeptide from the posterior lobe of pig pituitaries. I. Isolation and characterization. *Eur J Biochem* **1972**, *28* (3), 334-9.
698. Fenske, W.; Stork, S.; Blechschmidt, A.; Maier, S. G.; Morgenthaler, N. G.; Allolio, B., Copeptin in the differential diagnosis of hyponatremia. *J Clin Endocrinol Metab* **2009**, *94* (1), 123-9.
699. Katan, M.; Fluri, F.; Morgenthaler, N. G.; Schuetz, P.; Zweifel, C.; Bingisser, R.; Muller, K.; Meckel, S.; Gass, A.; Kappos, L.; Steck, A. J.; Engelter, S. T.; Muller, B.; Christ-Crain, M., Copeptin: a novel, independent prognostic marker in patients with ischemic stroke. *Ann Neurol* **2009**, *66* (6), 799-808.
700. Bouby, N.; Bachmann, S.; Bichet, D.; Bankir, L., Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol* **1990**, *258* (4 Pt 2), F973-9.
701. Morgenthaler, N. G., Copeptin: a biomarker of cardiovascular and renal function. *Congest Heart Fail* **2010**, *16 Suppl 1*, S37-44.
702. Schill, F.; Persson, M.; Engstrom, G.; Melander, O.; Enhorning, S., Copeptin as a marker of atherosclerosis and arteriosclerosis. *Atherosclerosis* **2021**, *338*, 64-68.
703. Potier, L.; Roussel, R.; Marre, M.; Bjornstad, P.; Cherney, D. Z.; El Boustany, R.; Fumeron, F.; Venteclef, N.; Gautier, J. F.; Hadjadj, S.; Mohammedi, K.; Velho, G., Plasma Copeptin and Risk of Lower-Extremity Amputation in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2019**, *42* (12), 2290-2297.
704. Ozmen, C.; Deveci, O. S.; Karaaslan, M. B.; Baydar, O.; Akay, A.; Deniz, A.; Cagliyan, C. E.; Hanta, I.; Usal, A., Predictive value of plasma copeptin level for diagnosis and mortality of pulmonary embolism. *Rev Assoc Med Bras (1992)* **2020**, *66* (12), 1645-1650.
705. Kourtidou, C.; Stangou, M.; Marinaki, S.; Tziomalos, K., Novel Cardiovascular Risk Factors in Patients with Diabetic Kidney Disease. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (20).
706. Molvin, J.; Jujic, A.; Bachus, E.; Gallo, W.; Tasevska-Dinevska, G.; Holm, H.; Melander, O.; Fedorowski, A.; Magnusson, M., Cardiovascular biomarkers predict post-discharge re-hospitalization risk and mortality among Swedish heart failure patients. *ESC Heart Fail* **2019**, *6* (5), 992-999.
707. Barchetta, I.; Enhorning, S.; Cimini, F. A.; Capoccia, D.; Chiappetta, C.; Di Cristofano, C.; Silecchia, G.; Leonetti, F.; Melander, O.; Cavallo, M. G., Elevated plasma copeptin levels identify the presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease in obesity. *BMC Med* **2019**, *17* (1), 85.
708. Lu, J.; Wang, S.; He, G.; Wang, Y., Prognostic value of copeptin in patients with acute coronary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **2020**, *15* (8), e0238288.
709. Yoshikawa, Y.; Shiomi, H.; Kuwahara, K.; Sowa, N.; Yaku, H.; Yamashita, Y.; Tazaki, J.; Imai, M.; Kato, T.; Saito, N.; Shizuta, S.; Ono, K.; Kimura, T., Utility of copeptin for predicting long-term clinical outcomes in patients with heart failure. *J Cardiol* **2019**, *73* (5), 379-385.

710. Salgado, J. V.; Souza, F. L.; Salgado, B. J., How to understand the association between cystatin C levels and cardiovascular disease: Imbalance, counterbalance, or consequence? *J Cardiol* **2013**, *62* (6), 331-5.
711. Siklos, M.; BenAissa, M.; Thatcher, G. R., Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm Sin B* **2015**, *5* (6), 506-19.
712. Knight, E. L.; Verhave, J. C.; Spiegelman, D.; Hillege, H. L.; de Zeeuw, D.; Curhan, G. C.; de Jong, P. E., Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* **2004**, *65* (4), 1416-21.
713. Spencer, S.; Desborough, R.; Bhandari, S., Should Cystatin C eGFR Become Routine Clinical Practice? *Biomolecules* **2023**, *13* (7).
714. Madero, M.; Sarnak, M. J., Association of cystatin C with adverse outcomes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2009**, *18* (3), 258-63.
715. Matsushita, K.; Ballew, S. H.; Coresh, J., Cardiovascular risk prediction in people with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2016**, *25* (6), 518-523.
716. Lees, J. S.; Welsh, C. E.; Celis-Morales, C. A.; Mackay, D.; Lewsey, J.; Gray, S. R.; Lyall, D. M.; Cleland, J. G.; Gill, J. M. R.; Jhund, P. S.; Pell, J.; Sattar, N.; Welsh, P.; Mark, P. B., Glomerular filtration rate by differing measures, albuminuria and prediction of cardiovascular disease, mortality and end-stage kidney disease. *Nat Med* **2019**, *25* (11), 1753-1760.
717. West, M.; Kirby, A.; Stewart, R. A.; Blankenberg, S.; Sullivan, D.; White, H. D.; Hunt, D.; Marschner, I.; Janus, E.; Kritharides, L.; Watts, G. F.; Simes, J.; Tonkin, A. M.; *, L. S. G., Circulating Cystatin C Is an Independent Risk Marker for Cardiovascular Outcomes, Development of Renal Impairment, and Long-Term Mortality in Patients With Stable Coronary Heart Disease: The LIPID Study. *J Am Heart Assoc* **2022**, *11* (5), e020745.
718. Helmersson-Karlqvist, J.; Lipcsey, M.; Arnlov, J.; Bell, M.; Ravn, B.; Dardashti, A.; Larsson, A., Addition of cystatin C predicts cardiovascular death better than creatinine in intensive care. *Heart* **2022**, *108* (4), 279-284.
719. Lou, B.; Luo, Y.; Zhang, H.; Wu, H.; Jiang, G. T.; Liu, H.; Kan, K.; Hao, X.; Sun, L.; Yuan, Z.; She, J., Association between Cystatin C and Cardiac Function in Acute Myocardial Infarction Patients: A Real-World Analysis. *Dis Markers* **2022**, *2022*, 7267937.
720. Wu, X.; Xu, G.; Zhang, S., Association Between Cystatin C and Cardiac Function and Long-Term Prognosis in Patients with Chronic Heart Failure. *Med Sci Monit* **2020**, *26*, e919422.
721. Heinisch, P. P.; Bello, C.; Emmert, M. Y.; Carrel, T.; Dressen, M.; Horer, J.; Winkler, B.; Luedi, M. M., Endothelial Progenitor Cells as Biomarkers of Cardiovascular Pathologies: A Narrative Review. *Cells* **2022**, *11* (10).
722. Yan, F.; Liu, X.; Ding, H.; Zhang, W., Paracrine mechanisms of endothelial progenitor cells in vascular repair. *Acta Histochem* **2022**, *124* (1), 151833.
723. Majesky, M. W.; Dong, X. R.; Högglund, V.; Mahoney, W. M., Jr.; Daum, G., The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**, *31* (7), 1530-9.
724. Hill, J. M.; Zalos, G.; Halcox, J. P.; Schenke, W. H.; Waclawiw, M. A.; Quyyumi, A. A.; Finkel, T., Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* **2003**, *348* (7), 593-600.
725. Matsuda, T.; Miyagawa, S.; Fukushima, S.; Kitagawa-Sakakida, S.; Akimaru, H.; Horii-Komatsu, M.; Kawamoto, A.; Saito, A.; Asahara, T.; Sawa, Y., Human cardiac stem

cells with reduced notch signaling show enhanced therapeutic potential in a rat acute infarction model. *Circ J* **2014**, *78* (1), 222-31.

726. Smadja, D. M.; Cornet, A.; Emmerich, J.; Aiach, M.; Gaussem, P., Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol* **2007**, *23* (4), 223-39.

727. Lee, K. W.; Lip, G. Y.; Tayebjee, M.; Foster, W.; Blann, A. D., Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* **2005**, *105* (2), 526-32.

728. Pu, X.; Du, L.; Hu, Y.; Fan, Y.; Xu, Q., Stem/Progenitor Cells and Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2021**, *41* (1), 167-178.

729. Sabbah, N.; Tamari, T.; Elimelech, R.; Doppelt, O.; Rudich, U.; Zigdon-Giladi, H., Predicting Angiogenesis by Endothelial Progenitor Cells Relying on In-Vitro Function Assays and VEGFR-2 Expression Levels. *Biomolecules* **2019**, *9* (11).

730. Voukalis, C.; Shantsila, E.; Lip, G. Y. H., Microparticles and cardiovascular diseases. *Ann Med* **2019**, *51* (3-4), 193-223.

731. van der Pol, E.; Boing, A. N.; Harrison, P.; Sturk, A.; Nieuwland, R., Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* **2012**, *64* (3), 676-705.

732. Shantsila, E.; Kamphuisen, P. W.; Lip, G. Y., Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* **2010**, *8* (11), 2358-68.

733. The Fourth International Meeting of ISEV, ISEV2015. *J Extracell Vesicles* **2015**, *4*, 27783.

734. Castellana, D.; Zobairi, F.; Martinez, M. C.; Panaro, M. A.; Mitolo, V.; Freyssinet, J. M.; Kunzelmann, C., Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* **2009**, *69* (3), 785-93.

735. Rautou, P. E.; Vion, A. C.; Amabile, N.; Chironi, G.; Simon, A.; Tedgui, A.; Boulanger, C. M., Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* **2011**, *109* (5), 593-606.

736. Ratajczak, J.; Wysoczynski, M.; Hayek, F.; Janowska-Wieczorek, A.; Ratajczak, M. Z., Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* **2006**, *20* (9), 1487-95.

737. Mostefai, H. A.; Agouni, A.; Carusio, N.; Mastronardi, M. L.; Heymes, C.; Henrion, D.; Andriantsitohaina, R.; Martinez, M. C., Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells. *J Immunol* **2008**, *180* (7), 5028-35.

738. Benameur, T.; Soleti, R.; Porro, C.; Andriantsitohaina, R.; Martinez, M. C., Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One* **2010**, *5* (9), e12688.

739. Wang, Y.; Chen, L. M.; Liu, M. L., Microvesicles and diabetic complications--novel mediators, potential biomarkers and therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin* **2014**, *35* (4), 433-43.

740. Santilli, F.; Marchisio, M.; Lanuti, P.; Bocatonda, A.; Miscia, S.; Davi, G., Microparticles as new markers of cardiovascular risk in diabetes and beyond. *Thromb Haemost* **2016**, *116* (2), 220-34.

741. McDonough, C. W., Pharmacogenomics in Cardiovascular Diseases. *Curr Protoc* **2021**, 1 (7), e189.
742. Roden, D. M., Cardiovascular pharmacogenomics: current status and future directions. *J Hum Genet* **2016**, 61 (1), 79-85.
743. Koschinsky, M. L.; Boffa, M. B.; Nesheim, M. E.; Zinman, B.; Hanley, A. J.; Harris, S. B.; Cao, H.; Hegele, R. A., Association of a single nucleotide polymorphism in CPB2 encoding the thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAF1) with blood pressure. *Clin Genet* **2001**, 60 (5), 345-9.
744. Poller, W.; Dimmeler, S.; Heymans, S.; Zeller, T.; Haas, J.; Karakas, M.; Leistner, D. M.; Jakob, P.; Nakagawa, S.; Blankenberg, S.; Engelhardt, S.; Thum, T.; Weber, C.; Meder, B.; Hajjar, R.; Landmesser, U., Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *Eur Heart J* **2018**, 39 (29), 2704-2716.
745. Zhao, G., Significance of non-coding circular RNAs and micro RNAs in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *J Med Genet* **2018**, 55 (11), 713-720.
746. Gangwar, R. S.; Rajagopalan, S.; Natarajan, R.; Deiluiis, J. A., Noncoding RNAs in Cardiovascular Disease: Pathological Relevance and Emerging Role as Biomarkers and Therapeutics. *Am J Hypertens* **2018**, 31 (2), 150-165.
747. Jain, K. K., Personalized Management of Cardiovascular Disorders. *Med Princ Pract* **2017**, 26 (5), 399-414.
748. Rather, R. A.; Dhawan, V., Genetic markers: Potential candidates for cardiovascular disease. *Int J Cardiol* **2016**, 220, 914-23.
749. Al Rifai, M.; Yao, J.; Guo, X.; Post, W. S.; Malik, S.; Blumenthal, R. S.; Ballantyne, C. M.; Budoff, M.; Taylor, K. D.; Lin, H. J.; Rich, S. S.; Hajek, C.; Greenland, P.; Rotter, J. I.; Virani, S. S., Association of polygenic risk scores with incident atherosclerotic cardiovascular disease events among individuals with coronary artery calcium score of zero: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Prog Cardiovasc Dis* **2022**, 74, 19-27.
750. Frosst, P.; Blom, H. J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C. A.; Matthews, R. G.; Boers, G. J.; den Heijer, M.; Kluijtmans, L. A.; van den Heuvel, L. P.; et al., A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* **1995**, 10 (1), 111-3.
751. Rader, D. J.; Cohen, J.; Hobbs, H. H., Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* **2003**, 111 (12), 1795-803.
752. Voight, B. F.; Peloso, G. M.; Orho-Melander, M.; Frikke-Schmidt, R.; Barbalic, M.; Jensen, M. K.; Hindy, G.; Holm, H.; Ding, E. L.; Johnson, T.; Schunkert, H.; Samani, N. J.; Clarke, R.; Hopewell, J. C.; Thompson, J. F.; Li, M.; Thorleifsson, G.; Newton-Cheh, C.; Musunuru, K.; Pirruccello, J. P.; Saleheen, D.; Chen, L.; Stewart, A.; Schillert, A.; Thorsteinsdottir, U.; Thorgeirsson, G.; Anand, S.; Engert, J. C.; Morgan, T.; Spertus, J.; Stoll, M.; Berger, K.; Martinelli, N.; Girelli, D.; McKeown, P. P.; Patterson, C. C.; Epstein, S. E.; Devaney, J.; Burnett, M. S.; Mooser, V.; Ripatti, S.; Surakka, I.; Nieminen, M. S.; Sinisalo, J.; Lokki, M. L.; Perola, M.; Havulinna, A.; de Faire, U.; Gigante, B.; Ingelsson, E.; Zeller, T.; Wild, P.; de Bakker, P. I.; Klungel, O. H.; Maitland-van der Zee, A. H.; Peters, B. J.; de Boer, A.; Grobbee, D. E.; Kamphuisen, P. W.; Deneer, V. H.; Elbers, C. C.; Onland-Moret, N. C.; Hofker, M. H.; Wijmenga, C.; Verschuren, W. M.; Boer, J. M.; van der Schouw, Y. T.; Rasheed, A.; Frossard, P.; Demissie, S.; Willer, C.; Do, R.; Ordovas, J. M.; Abecasis, G. R.; Boehnke, M.; Mohlke, K. L.; Daly, M. J.; Guiducci, C.; Burt, N. P.; Surti, A.; Gonzalez, E.; Purcell, S.; Gabriel, S.; Marrugat, J.; Peden, J.; Erdmann, J.; Diemert, P.; Willenborg, C.; Konig, I. R.; Fischer, M.; Hengstenberg, C.; Ziegler, A.; Buysschaert, I.;

- Lambrechts, D.; Van de Werf, F.; Fox, K. A.; El Mokhtari, N. E.; Rubin, D.; Schrezenmeir, J.; Schreiber, S.; Schafer, A.; Danesh, J.; Blankenberg, S.; Roberts, R.; McPherson, R.; Watkins, H.; Hall, A. S.; Overvad, K.; Rimm, E.; Boerwinkle, E.; Tybjaerg-Hansen, A.; Cupples, L. A.; Reilly, M. P.; Melander, O.; Mannucci, P. M.; Ardissino, D.; Siscovick, D.; Elosua, R.; Stefansson, K.; O'Donnell, C. J.; Salomaa, V.; Rader, D. J.; Peltonen, L.; Schwartz, S. M.; Altshuler, D.; Kathiresan, S., Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* **2012**, *380* (9841), 572-80.
753. Cohen, J.; Pertsemlidis, A.; Kotowski, I. K.; Graham, R.; Garcia, C. K.; Hobbs, H. H., Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* **2005**, *37* (2), 161-5.
754. Chernogubova, E.; Strawbridge, R.; Mahdessian, H.; Malarstig, A.; Krapivner, S.; Gigante, B.; Hellenius, M. L.; de Faire, U.; Franco-Cereceda, A.; Syvanen, A. C.; Troutt, J. S.; Konrad, R. J.; Eriksson, P.; Hamsten, A.; van 't Hooft, F. M., Common and low-frequency genetic variants in the PCSK9 locus influence circulating PCSK9 levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2012**, *32* (6), 1526-34.
755. Fairoozy, R. H.; White, J.; Palmen, J.; Kalea, A. Z.; Humphries, S. E., Identification of the Functional Variant(s) that Explain the Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR) GWAS SNP rs6511720 Association with Lower LDL-C and Risk of CHD. *PLoS One* **2016**, *11* (12), e0167676.
756. Mirhafez, S. R.; Avan, A.; Pasdar, A.; Khatamianfar, S.; Hosseinzadeh, L.; Ganjali, S.; Movahedi, A.; Pirhoushiaran, M.; Mellado, V. G.; Rosace, D.; van Krieken, A.; Nohtani, M.; Ferns, G. A.; Ghayour-Mobarhan, M., Zinc Finger 259 Gene Polymorphism rs964184 is Associated with Serum Triglyceride Levels and Metabolic Syndrome. *Int J Mol Cell Med* **2016**, *5* (1), 8-18.
757. Wang, Y.; Wu, B.; Zhang, M.; Miao, H.; Sun, J., Significant association between rs28362491 polymorphism in NF-kappaB1 gene and coronary artery disease: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord* **2020**, *20* (1), 278.
758. Rai, H.; Fitzgerald, S.; Coughlan, J. J.; Spence, M.; Colleran, R.; Joner, M.; Byrne, R. A., Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and acute coronary syndrome or premature coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide* **2023**, *138-139*, 85-95.
759. Barbosa, P.; Abo El-Magd, N. F.; Hesketh, J.; Bermanno, G., The Role of rs713041 Glutathione Peroxidase 4 (GPX4) Single Nucleotide Polymorphism on Disease Susceptibility in Humans: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (24).
760. Feng, B.; Li, H., Genetic Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-9 and Susceptibility to Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. *Dis Markers* **2022**, *2022*, 5507153.
761. Rai, H.; Colleran, R.; Cassese, S.; Joner, M.; Kastrati, A.; Byrne, R. A., Association of interleukin 6 -174 G/C polymorphism with coronary artery disease and circulating IL-6 levels: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Res* **2021**, *70* (10-12), 1075-1087.
762. Hosseini, D. K.; Ataikia, S.; Hosseini, H. K.; Han, B.; Sun, H., Association of polymorphisms in ADAMTS-7 gene with the susceptibility to coronary artery disease - a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY)* **2020**, *12* (20), 20915-20923.
763. Gao, W.; Zhu, R.; Yang, L., Association of Tumor Necrosis Factor-Alpha-308 G/A and -238 G/A Polymorphism with Diabetic Retinopathy: A Systematic Review and Updated Meta-Analysis. *Ophthalmic Res* **2021**, *64* (6), 903-915.
764. Gao, J.; Collyer, J.; Wang, M.; Sun, F.; Xu, F., Genetic Dissection of Hypertrophic Cardiomyopathy with Myocardial RNA-Seq. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (9).

765. Evans, W. E.; Relling, M. V., Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **1999**, *286* (5439), 487-91.
766. Roden, D. M.; Stein, C. M., Clopidogrel and the concept of high-risk pharmacokinetics. *Circulation* **2009**, *119* (16), 2127-30.
767. Chasman, D. I.; Posada, D.; Subrahmanyam, L.; Cook, N. R.; Stanton, V. P., Jr.; Ridker, P. M., Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* **2004**, *291* (23), 2821-7.
768. Group, S. C.; Link, E.; Parish, S.; Armitage, J.; Bowman, L.; Heath, S.; Matsuda, F.; Gut, I.; Lathrop, M.; Collins, R., SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med* **2008**, *359* (8), 789-99.
769. Donnelly, L. A.; Palmer, C. N.; Whitley, A. L.; Lang, C. C.; Doney, A. S.; Morris, A. D.; Donnan, P. T., Apolipoprotein E genotypes are associated with lipid-lowering responses to statin treatment in diabetes: a Go-DARTS study. *Pharmacogenet Genomics* **2008**, *18* (4), 279-87.
770. Mega, J. L.; Simon, T.; Collet, J. P.; Anderson, J. L.; Antman, E. M.; Bliden, K.; Cannon, C. P.; Danchin, N.; Giusti, B.; Gurbel, P.; Horne, B. D.; Hulot, J. S.; Kastrati, A.; Montalescot, G.; Neumann, F. J.; Shen, L.; Sibbing, D.; Steg, P. G.; Trenk, D.; Wiviott, S. D.; Sabatine, M. S., Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* **2010**, *304* (16), 1821-30.
771. Sibbing, D.; Koch, W.; Gebhard, D.; Schuster, T.; Braun, S.; Stegherr, J.; Morath, T.; Schomig, A.; von Beckerath, N.; Kastrati, A., Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* **2010**, *121* (4), 512-8.
772. Aithal, G. P.; Day, C. P.; Kesteven, P. J.; Daly, A. K., Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* **1999**, *353* (9154), 717-9.
773. Limdi, N. A.; Wadelius, M.; Cavallari, L.; Eriksson, N.; Crawford, D. C.; Lee, M. T.; Chen, C. H.; Motsinger-Reif, A.; Sagreiya, H.; Liu, N.; Wu, A. H.; Gage, B. F.; Jorgensen, A.; Pirmohamed, M.; Shin, J. G.; Suarez-Kurtz, G.; Kimmel, S. E.; Johnson, J. A.; Klein, T. E.; Wagner, M. J.; International Warfarin Pharmacogenetics, C., Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood* **2010**, *115* (18), 3827-34.
774. Fang, Y.; Xu, Y.; Wang, R.; Hu, L.; Guo, D.; Xue, F.; Guo, W.; Zhang, D.; Hu, J.; Li, Y.; Zhang, W.; Zhang, M., Recent advances on the roles of lncRNAs in cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* **2020**, *24* (21), 12246-12257.
775. Fu, Y.; Sun, H., Biogenesis, cellular effects, and biomarker value of circHIPK3. *Cancer Cell Int* **2021**, *21* (1), 256.
776. Singh, D. D.; Kim, Y.; Choi, S. A.; Han, I.; Yadav, D. K., Clinical Significance of MicroRNAs, Long Non-Coding RNAs, and CircRNAs in Cardiovascular Diseases. *Cells* **2023**, *12* (12).
777. Bagga, S.; Bracht, J.; Hunter, S.; Massirer, K.; Holtz, J.; Eachus, R.; Pasquinelli, A. E., Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* **2005**, *122* (4), 553-63.
778. Lewis, B. P.; Burge, C. B.; Bartel, D. P., Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **2005**, *120* (1), 15-20.

779. Zampetaki, A.; Willeit, P.; Drozdov, I.; Kiechl, S.; Mayr, M., Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc Res* **2012**, 93 (4), 555-62.
780. Cathcart, P.; Lucchesi, W.; Ottaviani, S.; De Giorgio, A.; Krell, J.; Stebbing, J.; Castellano, L., Noncoding RNAs and the control of signalling via nuclear receptor regulation in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2015**, 29 (4), 529-43.
781. Murakami, Y.; Yasuda, T.; Saigo, K.; Urashima, T.; Toyoda, H.; Okanoue, T.; Shimotohno, K., Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* **2006**, 25 (17), 2537-45.
782. Kosaka, N.; Iguchi, H.; Yoshioka, Y.; Takeshita, F.; Matsuki, Y.; Ochiya, T., Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* **2010**, 285 (23), 17442-52.
783. Song, R.; Hu, X. Q.; Zhang, L., Mitochondrial MiRNA in Cardiovascular Function and Disease. *Cells* **2019**, 8 (12).
784. Searles, C. D., MicroRNAs and Cardiovascular Disease Risk. *Curr Cardiol Rep* **2024**, 26 (2), 51-60.
785. Krutzfeldt, J.; Poy, M. N.; Stoffel, M., Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nat Genet* **2006**, 38 Suppl, S14-9.
786. Zhou, S. S.; Jin, J. P.; Wang, J. Q.; Zhang, Z. G.; Freedman, J. H.; Zheng, Y.; Cai, L., miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin* **2018**, 39 (7), 1073-1084.
787. Cheng, H. H.; Yi, H. S.; Kim, Y.; Kroh, E. M.; Chien, J. W.; Eaton, K. D.; Goodman, M. T.; Tait, J. F.; Tewari, M.; Pritchard, C. C., Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One* **2013**, 8 (6), e64795.
788. Le, L. T. T.; Nhu, C. X. T., The Role of Long Non-Coding RNAs in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci* **2023**, 24 (18).

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.