

## ΕΙΔΙΚΟ ΑΡΘΡΟ SPECIAL ARTICLE

# Νέο πρωτόκολλο δημιουργίας και μελέτης ανευρύσματος κοιλιακής αορτής με έγχυση παγκρεατικής ελαστάσης σε επίμυες

Η ανευρυσματική νόσος είναι μια συνεχώς εξελισσόμενη διαδικασία που περιλαμβάνει ολόκληρη την αορτή. Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) αποτελεί σημαντικό πρόβλημα εξ αιτίας του κινδύνου ρήξης και του υψηλού ποσοστού θανάτων που προκαλεί η ρήξη αυτού. Ενώ και τα μικρά ανευρύσματα μπορεί να οδηγηθούν σε ρήξη, πιο μεγάλο κίνδυνο έχουν τα μεγαλύτερα και γι' αυτόν το λόγο η πρώιμη και έγκαιρη διάγνωση μέσω προσυμπτωματικού ελέγχου (screening), καθώς και η κατάλληλη εκτίμηση και ο προσδιορισμός των ανευρυσμάτων εκείνων που εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα για ρήξη, αποτελούν τα κλειδιά για τη διαχείριση και την έρευνα αναφορικά με τα ΑΚΑ. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν προς το παρόν ειδικοί εργαστηριακοί δείκτες που θα παρείχαν τη δυνατότητα διάκρισης των ασθενών με ανεύρυσμα σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. Στόχος του παρόντος πειράματος είναι η παρουσίαση και η ανάλυση της εξ αντικειμένου αδήριτης ανάγκης για τον προσδιορισμό και τη διαμόρφωση εκείνων των βιοδεικτών που θα περιγράφουν με αξιοπιστία τη βιολογική συμπεριφορά και τη φυσική ιστορία (παθογένεση, αύξηση και ρήξη) του ΑΚΑ.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) είναι μια σχετικά συχνή και δυνητικά απειλητική για τη ζωή νόσος, με επιπολασμό που κυμαίνεται από 4,1–11,5% στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς.<sup>1</sup> Η πλέον τρομακτική και θορυβώδης επιπλοκή του ΑΚΑ είναι η ρήξη, που συχνά οδηγεί και στο θάνατο του ασθενούς.

Ενώ και τα μικρά ανευρύσματα μπορεί να οδηγηθούν σε ρήξη, πιο μεγάλο κίνδυνο έχουν τα μεγαλύτερα και γι' αυτόν το λόγο η πρώιμη και έγκαιρη διάγνωση μέσω προσυμπτωματικού ελέγχου (screening), καθώς και η κατάλληλη εκτίμηση και ο προσδιορισμός των ανευρυσμάτων

εκείνων που εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα για ρήξη, αποτελούν τα κλειδιά για τη διαχείριση και την έρευνα αναφορικά με τα ΑΚΑ.

Η παθοφυσιολογία της νόσου έγκειται στην εντοπισμένη δομική εκφύλιση του αορτικού τοιχώματος, η οποία οδηγεί σε σταδιακή διάταση της αορτής και τελικά σε ρήξη αυτής.<sup>2</sup> Η καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών αποτελεί σημαντικό βήμα στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας και του ρόλου των μοριακών και των γενετικών βιοδεικτών, καθώς και στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

Δυστυχώς, δεν υπάρχουν προς το παρόν ειδικοί εργαστηριακοί δείκτες που θα παρείχαν τη δυνατότητα

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2015, 32(5):636–644  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2015, 32(5):636–644

Δ. Μώρης,<sup>1</sup>  
Χ. Μπακογιάννης,<sup>1</sup>  
Ε. Ντούση,<sup>2</sup>  
Π. Τσακιρόπουλος,<sup>2</sup>  
Ν. Τσακιρόπουλος,<sup>2</sup>  
Χ. Τσιγκρής,<sup>1</sup>  
Δ. Περρέα,<sup>2</sup>  
Σ. Γεωργόπουλος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Α΄ Χειρουργική Κλινική, Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα  
<sup>2</sup>Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Novel protocol for creation and study of abdominal aortic aneurysm with porcine pancreatic elastase infusion in rats

Abstract at the end of the article

## Λέξεις ευρητηρίου

Ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ)  
Βιοδείκτες  
Μοντέλα με πειραματόζωα  
Παγκρεατική ελαστάση

Υποβλήθηκε 7.3.2015  
Εγκρίθηκε 14.3.2015

διάκρισης των ασθενών με ανεύρυσμα σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. Η χρήση ιστών έχει αρκετά μειονεκτήματα, όπως η δυσκολία στην εύρεση δειγμάτων ελέγχου (control samples), καθώς και το σφάλμα λόγω χρήσης φυσιολογικών δειγμάτων από πτωματικούς δότες, δότες οργάνων ή ασθενείς με άλλα νοσήματα.

Το περιφερικό αίμα είναι ένα πολύπλοκο υγρό με υψηλό ρυθμό κυτταρικής ανακύκλωσης (turnover), το οποίο εξασφαλίζει τη δυναμική προσέγγιση της κατάστασης κάθε ιστού. Από τη στιγμή που τα δείγματα αίματος μπορούν να συλλέγονται εύκολα, χωρίς ιδιαίτερη δυσφορία από τους ασθενείς, βιοδείκτες προερχόμενοι από το RNA του αίματος προσφέρουν καλύτερη ενσωμάτωση στην κλινική και την απεικονιστική πρακτική για τη διάγνωση και την πρόγνωση του ΑΚΑ.

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΑΙ ΑΝΕΥΡΥΣΜΑ ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΑΟΡΤΗΣ

Παρόλο που οι μελέτες σε ανθρώπινες αορτές (ιστολογικά παρασκευάσματα), κατά τη χειρουργική αποκατάσταση, έχουν προσφέρει σημαντικά στοιχεία στην κατανόηση της παθογένεσης του ΑΚΑ, αδυνατούν να παράσχουν πολλές πληροφορίες όσον αφορά στις δυναμικές αλλαγές οι οποίες σχετίζονται με την πρόοδο του ΑΚΑ, καθώς τα εν λόγω παρασκευάσματα είναι προϊόντα «τελικού σταδίου» της νόσου. Η διαμόρφωση μικρών πειραματικών μοντέλων δημιουργίας ΑΚΑ παρέχουν γι' αυτόν το λόγο σημαντικά πλεονεκτήματα, επιτρέποντας πιο ενδελεχή μελέτη στους κυτταρικούς και στους μοριακούς μηχανισμούς της νόσου σε ένα προσωρινά ελεγχόμενο περιβάλλον.<sup>3-5</sup>

Συνεπώς, αρκετή από τη γνώση σχετικά με την παθοφυσιολογία του ΑΚΑ προέρχεται από την έρευνα σε πειραματικά μοντέλα, όπως οι ανευρυσματικές αορτικές βλάβες που αναπτύσσονται μετά από παροδική χορήγηση στην κοιλιακή αορτή χοίρειας παγκρεατικής ελαστάσης (PPE).<sup>6</sup>

Το βασικό επιστημονικό πρόταγμα των πειραματικών

μοντέλων έγκειται στο γεγονός ότι μιμούνται τα κυτταρικά και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της παθογένεσης και της προόδου της ανθρώπινης νοσολογίας. Στην περίπτωση του ΑΚΑ, υπάρχει σχετική έλλειψη πληροφοριών για τη μέτρηση και την εξασφάλιση της πιστότητας της αναπαραγωγής της ανθρώπινης νοσολογίας στα πειραματικά μοντέλα. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι προσεγγίσεις για τον καθορισμό της αιτιολογίας του ΑΚΑ.

Το πειραματικό μοντέλο της παγκρεατικής ελαστάσης στο ΑΚΑ έχει χρησιμοποιηθεί με υψηλή πιστότητα ευρέως, τόσο σε αρουραίους όσο και σε ποντίκια, όπου διερευνήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί και η λειτουργία των μεσολαβητών φλεγμονής και των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας του ΑΚΑ, όπως και οι πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι καταστολής της αύξησης του σχηματισμού και της αύξησης του ΑΚΑ.

Αν και έχουν περιγραφεί πολλά, το πλέον γνωστό μοντέλο δημιουργίας και μελέτης της παθοφυσιολογίας του ΑΚΑ από παγκρεατική ελαστάση είναι αυτό των Anidjar et al.<sup>7-9</sup>

Η παθοφυσιολογική λογική πίσω από τη γένεση του ΑΚΑ σε αυτά τα πειραματόζωα βασίζεται στη διαταραχή της σύστασης της ελαστίνης στην αορτή και στην αναγκαιότητα της ύπαρξης της ελαστίνης για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του αγγείου.<sup>10</sup> Στα περισσότερα εργαστήρια που εφαρμόζουν αυτό το μοντέλο, μόνο ήπια διάταση της αορτής παρατηρείται άμεσα μετά από την έγχυση της ουσίας, ενώ συγχρόνως διαπιστώνονται λίγα στοιχεία αποδόμησης της ελαστίνης στο μικροσκόπιο.<sup>6</sup>

Στο παραπάνω πρωτόκολλο, η αορτική διάμετρος παραμένει σταθερή για 7 ημέρες, μετά τις οποίες παρατηρείται ραγδαία αύξηση της αορτικής διαμέτρου. Στο πέρας των 14 ημερών αναπτύσσονται τυπικά τα πειραματικά ΑΚΑ, και μάλιστα με διάμετρο τουλάχιστον 100% μεγαλύτερη από εκείνη της φυσιολογικής (πριν από την έγχυση) αορτής.

Η εν λόγω καθυστέρηση στην έναρξη της διάτασης της αορτής, στο συγκεκριμένο μοντέλο, σχετίζεται με την

**Πίνακας 1.** Προσεγγίσεις για τον καθορισμό της αιτιολογίας του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ).

	<b>Δυνατότητες</b>	<b>Μειονεκτήματα</b>
<i>Έρευνες αξιολόγησης ιστών από ΑΚΑ</i>	Εντοπισμός αιτιολογικών παραγόντων Εντοπισμός παραγόντων που επάγουν την αύξηση του ΑΚΑ Προσδιορισμός παθογενετικών μηχανισμών και γονιδίων	Μη σταθερότητα αιτιολογικών παραγόντων Λανθασμένη αποδοχή του επιφαινόμενου ως αιτιολογικού παράγοντα
<i>Συστηματικές ανωμαλίες ασθενών με ΑΚΑ</i>	Πιθανότατη αναγνώριση αιτιολογικών παραγόντων αντί επιφαινόμενων	Πολλές πρωτεΐνες και γονίδια προς ανάλυση
<i>Μοντέλα με πειραματόζωα</i>	Οριοθέτηση ή αλλαγή μηχανισμών δημιουργίας ΑΚΑ	Εσφαλμένες πληροφορίες, εκτός εάν το πείραμα ανακεφαλαιώνει την παθοφυσιολογία του ΑΚΑ στον άνθρωπο

παροδική και τμηματική διήθηση του αορτικού τοιχώματος με μονοκύτταρα, με την αυξημένη τοπική έκφραση της ελαστολυτικής δράσης των MMPs και με την εξεσημασμένη καταστροφή του έσω ελαστικού χιτώνα.<sup>11</sup>

Γι' αυτόν το λόγο, το συγκεκριμένο μοντέλο με την έγχυση της παγκρεατικής ελαστάσης είναι το καταλληλότερο για τη μελέτη του ρόλου της χρόνιας φλεγμονής και των ειδικών ενζύμων αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας στην εκφύλιση του αορτικού τοιχώματος και για τη δοκιμή των επιπτώσεων διαφορετικών φαρμακευτικών παραγόντων ή γενετικών μεταβολών στη δημιουργία του ΑΚΑ.

Το παραπάνω μοντέλο είναι παρόμοιο ιστολογικά και αιμοδυναμικά με το φυσικό ανθρώπινο ΑΚΑ και γι' αυτό η έγχυση ελαστάσης αποτελεί την πιο συχνή μέθοδο δημιουργίας ΑΚΑ σε πειραματόζωα.<sup>7,10,12-18</sup> Ένα ενδιαφέρον εύρημα του πειραματικού μοντέλου είναι το φαινόμενο της λανθάνουσας κατάστασης, δηλαδή της μετάχρονης αύξησης της διαμέτρου της αορτής σε χρόνο διαφορετικό από αυτόν της έγχυσης, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία επιπρόσθετων μονοπατιών δημιουργίας του ΑΚΑ εκτός από την αρχική βλάβη και τον ενδοθηλιακό τραυματισμό.<sup>13</sup> Παρά την πιστότητα του πειραματικού μοντέλου με την ανθρώπινη νόσο οι τεχνικές δυσκολίες του πειράματος είναι μεγάλες, γιατί απαιτείται κανουλάρισμα αγγείου μετρικά μικρής διαμέτρου λόγω διάπλασης του πειραματοζώου (αορτή ή ακόμη και κοινή λαγόνιος αρτηρία), καθιστώντας τη χειρουργική επέμβαση πιο απαιτητική τεχνικά και πολύπλοκη. Πιθανή διαφυγή της ελαστάσης ενδεχομένως να οδηγήσει σε χειρουργική-πειραματική αποτυχία ή ακόμη και στο θάνατο του ζώου.

### 3. ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ;

Οι βιοδείκτες έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον αναφορικά με το επιστημονικό πεδίο της φυσικής ιστορίας του ΑΚΑ και ορίζονται ως μετρήσιμα μόρια (πεπτίδια, πρωτεΐνες, προϊόντα μεταβολισμού), τα οποία εκφράζουν και αποτυπώνουν συγκεκριμένες και ειδικές βιολογικές διεργασίες στον οργανισμό μια δεδομένη χρονική στιγμή.<sup>19</sup>

Για να θεωρηθεί κάποιος βιοδείκτης χρήσιμος κλινικά ή εργαστηριακά θα πρέπει να είναι σε θέση είτε αμέσως να προσδιορίζει κάποια νόσο ή να προδικάζει την εξέλιξη αυτής. Άρα στην παρούσα περίπτωση, ένας χρήσιμος βιοδείκτης θα ήταν αυτός που θα προσδιόριζε την παρουσία ενός υποκλινικού ΑΚΑ ή θα καθόριζε το μέγεθος και το ρυθμό αύξησης του ΑΚΑ και συνεπώς την πιθανότητα ρήξης αυτού.<sup>20</sup>

Ένας ή περισσότεροι βιοδείκτες μπορούν να είναι ενδεικτικοί κάποιας νόσου ή της προόδου αυτής. Όσον αφορά

στο ΑΚΑ, η διάμετρος και ο ρυθμός αύξησης αντανακλούν την εκφυλιστική διεργασία του αορτικού τοιχώματος και κατ' επέκταση αποτελούν αρχόμενο δείκτη για πιθανή ρήξη. Η τρέχουσα έρευνα συνεχίζει να αναζητά δείκτες πέραν του μεγέθους που να προσδιορίζουν τον κίνδυνο ρήξης.<sup>21</sup>

Οι βιοδείκτες μπορούν επίσης να προσδιορίσουν πιθανά παθοφυσιολογικά μονοπάτια και από αυτά να δώσουν ώθηση για φαρμακευτική αναστολή της αύξησης του ΑΚΑ και την παρακολούθηση αυτής. Και από τη στιγμή που η διάμετρος και ο ρυθμός αύξησης του ΑΚΑ αποτελούν τους καθοριστικούς παράγοντες για τη ρήξη και την ανάγκη για εκλεκτική αποκατάστασή του, οι βιοδείκτες που θα σχετιστούν με την ταχύτερη αύξηση του ΑΚΑ θα είναι χρήσιμοι τόσο στην κλινική πρακτική όσο και στην έγκαιρη διάγνωση και την πρόληψη.

Επιπρόσθετα, ένας βιοδείκτης θα μπορούσε να καθορίσει και τα ιδανικά χρονικά διαστήματα για την παρακολούθηση και πιθανότατα να εντοπίσει τα μονοπάτια παθοφυσιολογίας στη φυσική ιστορία του ΑΚΑ και να συνδράμει στην παρακολούθηση και τη θεραπεία αυτού.<sup>22</sup>

Δεν πρέπει να παραλειφθεί και το γεγονός ότι ένας βιοδείκτης, για να είναι χρήσιμος στα σύγχρονα συστήματα υγείας, θα πρέπει να έχει ικανοποιητική σχέση κόστους/αποτελεσματικότητας. Και επειδή οι προαναφερθείσες απεικονιστικές τεχνικές έχουν *a priori* τα μειονεκτήματα του αυξημένου κόστους και του ιατρικού υποκειμενισμού, οι βιοδείκτες μπορούν να αποτελέσουν ελκυστική εναλλακτική για λόγους προσυμπτωματικού ελέγχου (screening) και παρακολούθησης, ιδίως σε συστήματα υγείας που στερούνται υποδομών υποστήριξης πρωτογενών ή δευτερογενών προγραμμάτων screening.

Πολλοί πιθανοί βιοδείκτες έχουν μελετηθεί για την εκτίμηση της αύξησης του ΑΚΑ. Τα πεπτίδια της ελαστάσης στον ορό δείχνουν να είναι επαρκή στην πρόβλεψη της αύξησης και της ρήξης του ΑΚΑ, αλλά απαιτούνται προηγμένες τεχνικές (ELISA) και μεγαλύτερες τεχνικές για την ταυτοποίηση του ακριβούς τους ρόλου. Οι βιοδείκτες με τη μεγαλύτερη συσχέτιση με τη φυσική ιστορία του ΑΚΑ σχετίζονται επίσης και με την παρουσία ενδοαυλικού θρόμβου, όπου ο λεπτός θρόμβος αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα υψηλών συγκεντρώσεων MMP-9 και CRP.<sup>23</sup>

Η σύγχρονη έρευνα αναφορικά με το θέμα των βιοδεικτών στο ΑΚΑ έρχεται αντιμέτωπη με πολλούς περιορισμούς, που σχετίζονται με το γεγονός ότι πολλοί βιοδείκτες δεν είναι ειδικοί για το ΑΚΑ λόγω της καλά τεκμηριωμένης συσχέτισής τους με την αθηρωματική νόσο.

Επιπρόσθετα, το ΑΚΑ είναι μια πολυπαραγοντική νόσος

που σχετίζεται τόσο με γενετικές μεταλλάξεις όσο και με περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα. Η μελλοντική έρευνα αναφορικά με το θέμα πρέπει να εστιάσει στους υποκείμενους μηχανισμούς συσχέτισης των εν λόγω βιοδεικτών με τη φυσική ιστορία του ΑΚΑ μέσω μεγάλων μακροπρόθεσμων μελετών παρατήρησης και παρέμβασης. Νέες μέθοδοι περιλαμβάνουσες την πρωτεομική και τη γενετική μπορούν να αναδείξουν νέα παθοφυσιολογικά μονοπάτια και βιοδείκτες.<sup>24</sup>

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η κλινική αξία των βιοδεικτών βασίζεται στις ιδιότητές τους να ικανοποιούν τους στόχους της έγκαιρης διάγνωσης (screening), της επιτήρησης με την έννοια της αρχικής και της απώτερης εξέλιξης της νόσου και της παρακολούθησης της βιολογικής συμπεριφοράς του ΑΚΑ μετά τη χειρουργική αντιμετώπισή του. Ο ιδανικός βιοδείκτης πρέπει να πληροί και τις τρεις προϋποθέσεις.

Η πρώιμη και στενή επιτήρηση μπορεί να ωφελήσει σημαντικά τους ασθενείς, επειδή οδηγούνται σε εκλεκτική αποκατάσταση του ΑΚΑ με μικρότερο εγχειρητικό κίνδυνο σε σχέση με την επείγουσα αντιμετώπισή του.<sup>25-27</sup> Η θνητότητα της εκλεκτικής αποκατάστασης ανέρχεται στο 5% ή λιγότερο, αλλά αν επισυμβεί η ρήξη η διεγχειρητική θνητότητα φθάνει μέχρι και το 48%.<sup>28</sup> Επίσης, υπάρχουν μελέτες που διαπιστώνουν αυξημένο κόστος της ανοικτής αποκατάστασης του ραγέντος ΑΚΑ (ΡΑΚΑ) σε σχέση με την εκλεκτική αποκατάσταση· ενίοτε και >5 φορές μεγαλύτερο για κάθε ασθενή που σώζεται ανά χρόνο, με το κόστος για την επείγουσα αποκατάσταση μέσω EVAR να είναι ακόμη υψηλότερο.<sup>29,30</sup>

Πολλές ανεπτυγμένες χώρες, όπως οι ΗΠΑ, το Ηνωμένο Βασίλειο και η Σουηδία, έχουν θεσμοθετήσει εθνικά προγράμματα screening για ΑΚΑ βασισμένα στην υπερηχοτομογραφία, με σημαντικά αποτελέσματα στο επίπεδο της πρώιμης διάγνωσης και της παρακολούθησης.<sup>31-36</sup> Δυστυχώς, δεν ισχύει το ίδιο και σε άλλες χώρες που δεν μπορούν να χρηματοδοτήσουν το υψηλό κόστος ευρείας εφαρμογής ενός τέτοιου προγράμματος screening.<sup>35</sup> Πιο συγκεκριμένα, σε μια πρόσφατη μελέτη<sup>37,38</sup> βρέθηκε ότι το εξατομικευμένο κόστος ανά άτομο ήταν € 60 (US \$ 83,2) και 0,011 επί πλέον σταθμισμένα με την ποιότητα ζωής έτη (QALY) κερδήθηκαν ανά ασθενή, αντιστοιχώντας σε ένα λόγο κόστους/αποτελεσματικότητας του ύψους των € 5.673/QALY (US \$ 7.870/QALY).<sup>38</sup> Τα εν λόγω ποσά είναι πολύ δύσκολο να προσεγγιστούν σε μια περίοδο παγκόσμιας οικονομικής κρίσης.

Λαμβάνοντας υπ' όψη το σχετικά μεγάλο επιπολασμό της νόσου, την υψηλή θνητότητα σε περιπτώσεις ρήξης, καθώς και τα υψηλά κόστη για νοσηλεία και εντατική θεραπεία,<sup>39</sup>

ακόμη και μετά από EVAR, φαίνεται αναγκαίο να καθιερωθούν και οι βιοδείκτες, οι οποίοι μπορούν να εφαρμοστούν στην καθημερινή ιατρική πρακτική και συγχρόνως θα είναι αποτελεσματικοί σε σχέση με το κόστος τους.<sup>24</sup>

#### 4. ΣΚΟΠΟΣ ΠΑΡΟΝΤΟΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Σκοπός του παρόντος πειράματος<sup>40-57</sup> είναι η μελέτη και ο εντοπισμός βιοδεικτών που να σχετίζονται ισχυρά τόσο στατιστικά όσο και παθολογικά και παθολογοανατομικά με το ρυθμό αύξησης του ανευρύσματος, ώστε να μπορεί μέσω αυτών να καθοριστεί η φυσική ιστορία ενός ανευρύσματος (ταχεία αύξηση και ρήξη) και να σχεδιαστεί η κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση.

Για τις ανάγκες της μελέτης στρατολογούνται 22 αρσενικά wistar rats (wild type), μέσου βάρους 417 g (εύρος 333–531 g). Στα 11 από αυτά θα δημιουργηθεί ΑΚΑ και τα 11 θα αποτελούν την ομάδα ελέγχου (sham group). Ως ανεύρυσμα ορίστηκε η αύξηση της αορτής στο 150% και πλέον της αρχικής διαμέτρου. Το ΑΚΑ θα δημιουργηθεί με τον κάτωθι τρόπο:

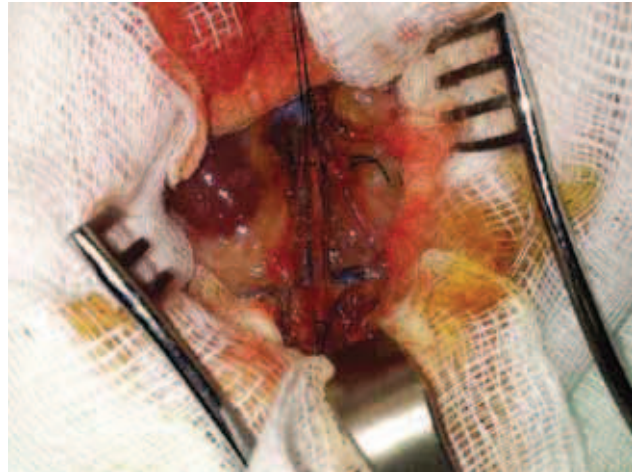
1. Πριν από την έναρξη του πειράματος, τα ζώα ζυγίζονται σε ειδική ηλεκτρονική ζυγαριά και λαμβάνουν ενδομυϊκά την εισαγωγή στην αναισθησία και την αναλγησία με συνοδό αντιβιοτική κάλυψη
2. Η προαναισθητική αγωγή περιλαμβάνει xylazine 1–5 mg/kg και ketamine 50–100 μmg/kg
3. Τα wistar rats θα αναισθητοποιηθούν με εισπνεόμενο isoflurane 2–3 mL/L
4. Τα wistar rats τοποθετούνται ύπτια στο χειρουργικό πεδίο
5. Διενεργείται αποστείρωση του κοιλιακού τοιχώματος με διάλυμα ιωδιούχου ποβιδόνης 10%
6. Εκτελείται μακριά μέση επιμήκης τομή με νυστέρι no 15. Προσεκτική μετατόπιση κοιλιακών σπλάγγων προς τα δεξιά και τοποθέτησή τους σε αποστειρωμένες γάζες εμβαπτισμένες σε φυσιολογικό ορό (N/S 0,9%)
7. Προσεκτική διάνοιξη οπισθίου περιτοναίου με χρήση εργαλείων μικροχειρουργικής και τολυπίων (στειλαιοί)
8. Αποκαλύπτεται και παρασκευάζεται η κοιλιακή αορτή από το ύψος της αριστερής νεφρικής φλέβας μέχρι το διχασμό της αορτής (εικ. 1)
9. Οι κλάδοι της αορτής απολινώνονται με 8-0 ράμματα, εφ' όσον χρειαστεί
10. Μόνιμες 4.0 απολινώσεις από μετάξι τοποθετούνται εγγύς και άπω στην αορτή (εικ. 2)



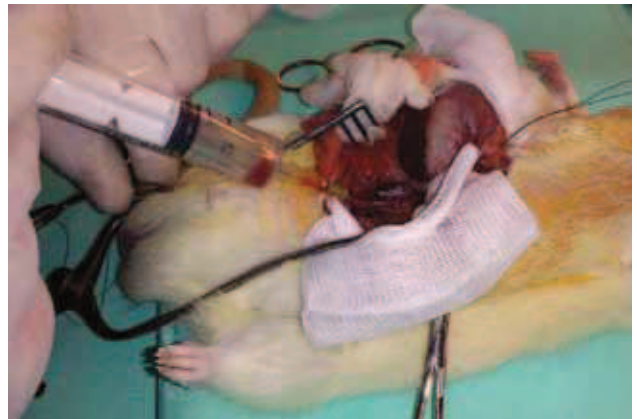


**Εικόνα 1.** Η αορτή μετά το τέλος της παρασκευής.

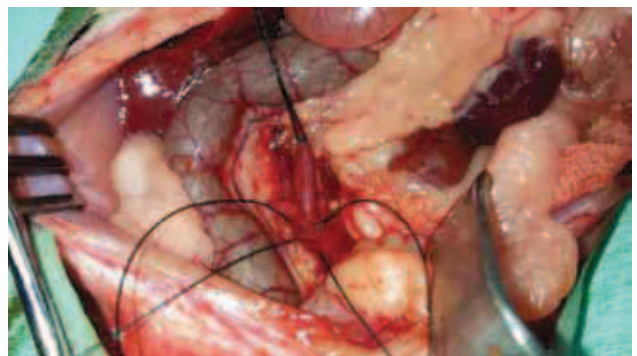
11. Η αορτοτομή γίνεται στο ύψος του διχασμού με φλεβοκαθετήρα 26-gauge
12. Χρησιμοποιώντας μια σύριγγα 10 mL που θα εξασφαλίσει υψηλές ενδοαορτικές πιέσεις (>100 mmHg), η αορτή γεμίζει με ορό που περιέχει 4,5 U/mL type I χοίρειας παγκρεατικής ελαστάσης (E1250-100 MG) σε διάλυμα 0,2 mL στα 10 mL φυσιολογικού ορού (N/S 0,9%) (εικ. 3)
13. Η αορτή διευρύνεται στο 120-140% της αρχικής διαμέτρου μετά το τέλος της έγχυσης, διάρκειας μέχρι 5 min (εικ. 4)
14. Στην ομάδα ελέγχου χορηγούνται 10 mL φυσιολογικού ορού (N/S 0,9%) χωρίς την παρουσία ελαστάσης, με την ίδια τεχνική όπως περιγράφηκε στο βήμα 11
15. Η μέτρηση της αορτής πραγματοποιείται με ειδικό υποδεκάμετρο πάντα από τον ίδιο μελετητή
16. Ο καθετήρας αφαιρείται και η τομή συγκλείεται με nylon ράμμα 8-0 ή 10-0, εάν χρειαστεί
17. Κατόπιν αφαιρούνται οι εγγύς και οι άπω απολινώσεις
18. Τα υπόλοιπα σπλάγχνα επανατοποθετούνται και η κοιλιά



**Εικόνα 2.** Ο αποκλεισμός της αορτής.



**Εικόνα 3.** Χορήγηση της ελαστάσης εντός της αορτής.



**Εικόνα 4.** Η διατεταμένη αορτή μετά το πέρας της έγχυσης.

συγκλείεται με συνεχόμενη ραφή με ράμμα Prolene 3-0 ή Dexon 3-0

19. Τα ποντίκια τοποθετούνται σε θερμό χώρο ανάνηψης και ανανήπτουν σε 15 min

20. Τα ζώα παρακολουθούνται ανά εβδομάδα για διάστημα 2 εβδομάδων, με λαπαροτομία και μέτρηση της αορτής
21. Στο τέλος των 2 εβδομάδων, τα ζώα θυσιάζονται σύμφωνα με τις προβλεπόμενες διαδικασίες από το Πειραματικό Χειρουργείο και την Κτηνιατρική Υπηρεσία
22. Οι αορτές αφαιρούνται και τοποθετούνται σε διάλυμα φορμόλης αραιωμένο σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα και αποστέλλονται στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για ιστολογική ανάλυση
23. Οι αιμοληψίες στα ζώα πραγματοποιούνται με τον προβλεπόμενο τρόπο από τους συνεργάτες του Πειραματικού Χειρουργείου σε χρόνο 0 (πριν από την έγχυση του διαλύματος ελαστάσης στην ομάδα ΑΚΑ ή του φυσιολογικού ορού στην ομάδα ελέγχου), σε χρόνο 7 (1 εβδομάδα μετά από το χειρουργείο) και σε χρόνο 14 (2 εβδομάδες μετά από το χειρουργείο). Τα αίματα φυλάσσονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5. ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΣΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Επειδή η έρευνα είναι ένα αέναο ταξίδι, πριν από την παρουσίαση των αποτελεσμάτων θα ήταν σημαντικό να παρατεθούν κάποια ενδιαφέροντα ευρήματα του πειράματος που μπορεί να αποτελέσουν το έναυσμα για περαιτέρω έρευνα και πειραματικό προβληματισμό.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα του πειραματικού μοντέλου είναι το φαινόμενο της λανθάνουσας κατάστασης, δηλαδή της μετάχρονης αύξησης της διαμέτρου της αορτής σε χρόνο διαφορετικό από αυτόν της έγχυσης, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία επιπρόσθετων μονοπατιών δημιουργίας του ΑΚΑ πέραν της αρχικής βλάβης (mechanical strain) και του ενδοθηλιακού τραυματισμού. Με απλά λόγια, ενώ μετά το πέρας της έγχυσης της ελαστάσης η αορτή αυξάνεται στο 120–140% της αρχικής διαμέτρου, στην πρώτη εβδομάδα παρακολούθησης η αορτή υπερβαίνει το 200% της αρχικής. Συνεπώς, οι πρώτες 7 ημέρες είναι οι καθοριστικές για τη δημιουργία του ΑΚΑ.

Με αυτό το δεδομένο, για τη στενότερη επιτήρηση της ημερήσιας αύξησης της αορτής θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μια ειδικά διαμορφωμένη συσκευή υπερήχων, η οποία θα μετρούσε τη διάμετρο της αορτής χωρίς να υποβάλλεται το ζώο σε πολλαπλές, διαδοχικές λαπαροτομίες. Από την ερευνητική μας ομάδα έγινε προσπάθεια για ανεύρεση και εξασφάλιση μιας τέτοιας συσκευής, αλλά κατέστη αδύνατη η χρήση της, λόγω τεχνικών δυσχερειών.

Επιπρόσθετα, πρέπει να επισημανθεί ότι δεν χάθηκε κάποιο ζώο στο πλαίσιο της παρακολούθησης. Δηλαδή,

όλα τα ζώα της ομάδας ΑΚΑ εμφάνισαν ανεύρυσμα και κανένα ζώο δεν εμφάνισε ρήξη του ΑΚΑ.

Ακόμη, κατά τη δεύτερη εβδομάδα παρακολούθησης υπήρξαν ζώα που συνέχισαν να αυξάνουν τη διάμετρο της αορτής τους, ενώ άλλα όχι. Έτσι, φαίνεται ότι υπάρχουν περισσότερα του ενός πρότυπα αύξησης του ανευρύσματος (συνεχές-ασυνεχές). Άρα, για την περαιτέρω αύξηση της αορτής ίσως απαιτείται, κατά τη διάρκεια της επιτήρησης νέα έγχυση της ουσίας, με κίνδυνο βέβαια τη ρήξη της αορτής.

Συν τοις άλλοις, για την προτυποποίηση του πειράματος, προηγήθηκε μια πρώτη φάση πιλοτικής χρήσης της ελαστάσης και παρακολούθησης της βιολογικής συμπεριφοράς των ζώων. Εκεί διαπιστώθηκαν τα εξής: Κατ' αρχάς, απαιτείται άρτια κινητοποίηση της αορτής, χωρίς υποχρεωτική απολίνωση κλάδων της, για τον ομαλό αποκλεισμό της από την κυκλοφορία, στα σημεία που ήδη αναφέρθηκαν. Κατά τη διάρκεια αυτών των χειρισμών, ιδίως στο σημείο της κάτω απολίνωσης, είναι αρκετά εύκολος ο τραυματισμός της –πολύ μεγαλύτερης από την αορτή– κάτω κοίλης φλέβας, που σε αυτά τα ζώα, σχεδόν πάντα, ισοδυναμεί με απώλεια του πειραματοζώου.

Δεδομένης της αιμοδυναμικής ευαλωτότητας των ζώων, η υποδόρια χορήγηση ορού, πριν και κατά τη διάρκεια του πειράματος, φαίνεται ότι βοηθά στην ομαλή μετεγχειρητική πορεία.

Τέλος, ισχυρός προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης αυτών των ζώων μετεγχειρητικά, ίσως και περισσότερο από τη διεγχειρητική απώλεια αίματος, είναι ο χρόνος ισχαιμίας που προκαλείται από τον αποκλεισμό της αορτής. Γι' αυτό, η αορτή πρέπει να κλείνει και να ανοίγει πρώτα περιφερικά, ώστε να εξασφαλιστεί ομαλή αιματική παροχή στα σπλάγχνα και στα ευαίσθητα στην ισχαιμία κάτω άκρα.

Η χρήση αντιπηκτικών για την προφύλαξη των κάτω άκρων από πιθανή θρόμβωση λόγω του αορτικού αποκλεισμού δεν εφαρμόστηκε, γιατί η καλή και η ταχεία αιμοστατική συμπεριφορά των ζώων είναι σύμμαχος στην περίπτωση της αορτοτομής στο σημείο της παρακέντησης της βελόνης, ώστε να αποφευχθούν οι ραφές στην αορτή, που δυνητικά οδηγούν σε στένωση αυτής και περαιτέρω ισχαιμία στα κάτω άκρα.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η πειραματική προσέγγιση της φυσικής ιστορίας του ΑΚΑ με τη χορήγηση παγκρεατικής ελαστάσης ενδοαορτικά αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο δημιουργίας ΑΚΑ σε πολλαπλά μοντέλα πειραματοζώων. Το πείραμα είναι μέ-

τριας σφοδρότητας αν εφαρμοστεί με προσοχή, με μικρή καμπύλη εκμάθησης και παρέχει τη δυνατότητα μελέτης πολλαπλών βιοδεικτών που σχετίζονται με μονοπάτια φλεγμονής και ελαστολύσης-εκφύλισης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

#### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο Ίδρυμα Παιδείας και Ευρωπαϊκού Πολιτισμού (ΙΠΕΠ) για την ένθερμη και τιμητική υποστήριξη και αρωγή του στην εκπόνηση του παρόντος ερευνητικού πρωτοκόλλου.

#### ABSTRACT

##### Novel protocol for creation and study of abdominal aortic aneurysm with porcine pancreatic elastase infusion in rats

D. MORIS,<sup>1</sup> C. BAKOYIANNIS,<sup>1</sup> E. DOUSI,<sup>2</sup> P. TSAKIROPOULOS,<sup>2</sup> N. TSAKIROPOULOS,<sup>2</sup> C. TSIGRIS,<sup>1</sup> D. PERREA,<sup>2</sup> S. GEORGOPOULOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>First Department of Surgery, "Laiko" General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens,

<sup>2</sup>Division of Experimental Surgery, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

*Archives of Hellenic Medicine 2015, 32(5):636–644*

Abdominal aortic aneurysm (AAA) constitutes a serious threat for human life, especially the case where it is asymptomatic until rupture of the aneurysm, which is a common cause of death in subjects with AAA. There are no specific laboratory markers for distinguishing in a simple way between aneurysm bearers and the healthy population. Many biomarkers related to AAA outcome are not disease specific, due to their established correlation with atherosclerosis. Research is required to establish the underlying relations between these biomarkers and their role in AAA pathophysiology. With this experimental protocol, using the rabbit model, we aim to offer a conceptual description of potential biomarkers that will correlate with and predict the natural history of an AAA.

**Key words:** Abdominal aortic aneurysm (AAA), Animal models, Biomarkers, Porcine pancreatic elastase

#### Βιβλιογραφία

- CORNUZ J, SIDOTI PINTO C, TEVAEARAI H, EGGER M. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysms: Systematic review and meta-analysis of population-based screening studies. *Eur J Public Health* 2004, 14:343–349
- LEDERLE FA, JOHNSON GR, WILSON SE, BALLARD DJ, JORDAN WD Jr, BLEBEA J ET AL. Rupture rate of large abdominal aortic aneurysms in patients refusing or unfit for elective repair. *JAMA* 2002, 287:2968–2972
- DOBRIN PB. Animal models of aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1999, 13:641–648
- CARRELL TW, SMITH A, BURNAND KG. Experimental techniques and models in the study of the development and treatment of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 1999, 86:305–312
- DAUGHERTY A, CASSIS LA. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:429–434
- PYO R, LEE JK, SHIPLEY JM, CURCI JA, MAO D, ZIPORIN SJ ET AL. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000, 105:1641–1649
- ANIDJAR S, SALZMANN JL, GENTRIC D, LAGNEAU P, CAMILLERI JP, MICHEL JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* 1990, 82:973–981
- ANIDJAR S, DOBRIN PB, EICHORST M, GRAHAM GP, CHEJFEC G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1992, 16:139–147
- ANIDJAR S, DOBRIN PB, CHEJFEC G, MICHEL JB. Experimental study of determinants of aneurysmal expansion of the abdominal aorta. *Ann Vasc Surg* 1994, 8:127–136
- YAMAGUCHI T, YOKOKAWA M, SUZUKI M, HIGASHIDE S, KATOH Y, SUGIYAMA S ET AL. Morphologic changes in the aorta during elastase infusion in the rat aneurysm model. *J Surg Res* 2001, 95:161–166
- THOMPSON RW, CURCI JA, ENNIS TL, MAO D, PAGANO MB, PHAM CT. Pathophysiology of abdominal aortic aneurysms: Insights from the elastase-induced model in mice with different genetic backgrounds. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1085:59–73
- KOBAYASHI H, MATSUSHITA M, ODA K, NISHIKIMI N, SAKURAI T, KOMORI K. Effects of atherosclerotic plaque on the enlargement of an experimental model of abdominal aortic aneurysm in rabbits. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004, 28:71–78
- MICHINEAU S, DAI J, GERVAIS M, ZIDI M, CLOWES AW, BECQUEMIN JP ET AL. Aortic length changes during abdominal aortic aneurysm formation, expansion and stabilisation in a rat model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010, 40:468–474
- TANAKA A, HASEGAWA T, CHEN Z, OKITA Y, OKADA K. A novel rat model of abdominal aortic aneurysm using a combination



- of intraluminal elastase infusion and extraluminal calcium chloride exposure. *J Vasc Surg* 2009, 50:1423–1432
15. ZHANG Q, HUANG JH, XIA RP, DUAN XH, JIANG YB, JIANG Q ET AL. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysm in a rat model by the phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol. *J Surg Res* 2011, 167:e385–e393
  16. MATSUSHITA M, KOBAYASHI H, ODA K, NISHIKIMI N, SAKURAI T, NIMURA Y. A rabbit model of abdominal aortic aneurysm associated with intimal thickening. *Eur Surg Res* 1999, 31:305–313
  17. AASSAR OS, FUJIWARA NH, MARX WF, MATSUMOTO AH, KALLMES DF. Aneurysm growth, elastinolysis, and attempted doxycycline inhibition of elastase-induced aneurysms in rabbits. *J Vasc Intervent Radiol* 2003, 14:1427–1432
  18. PALMIERI D, PANE B, BARISONE C, SPINELLA G, GARIBALDI S, GHIGLIOTTI G ET AL. Resveratrol counteracts systemic and local inflammation involved in early abdominal aortic aneurysm development. *J Surg Res* 2011, 171:e237–e246
  19. BECKER RC. Emerging paradigms, platforms, and unifying themes in biomarker science. *J Am Coll Cardiol* 2007, 50:1777–1780
  20. LIMET R, SAKALIHASSAN N, ALBERT A. Determination of the expansion rate and incidence of rupture of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1991, 14:540–548
  21. SAKALIHASAN N, LIMET R, DEFAWE OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 2005, 365:1577–1589
  22. URBONAVICIUS S, URBONAVICIENE G, HONORÉ B, HENNEBERG EW, VORUM H, LINDHOLT JS. Potential circulating biomarkers for abdominal aortic aneurysm expansion and rupture – a systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008, 36:273–280
  23. WIERNICKI I, MILLO B, SAFRANOW K, GORECKA-SZYLD B, GUTOWSKI P. MMP-9, homocysteine and CRP circulating levels are associated with intraluminal thrombus thickness of abdominal aortic aneurysms: New implication of the old biomarkers. *Dis Markers* 2011, 31:67–74
  24. HTUN NM, PETER K. Biomarkers for AAA: Encouraging steps but clinical relevance still to be delivered. *Proteomics Clin Appl* 2014, 8:732–734
  25. UNITED KINGDOM EVAR TRIAL INVESTIGATORS; GREENHALGH RM, BROWN LC, POWELL JT, THOMPSON SG, EPSTEIN D ET AL. Endovascular versus open repair of abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 2010, 362:1863–1871
  26. HARRIS DA, AL-ALLAKA, THOMAS J, HEDGES AR. Influence of presentation on outcome in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006, 32:140–145
  27. DUECK AD, KUCEY DS, JOHNSTON KW, ALTER D, LAUPACIS A. Long-term survival and temporal trends in patient and surgeon factors after elective and ruptured abdominal aortic aneurysm surgery. *J Vasc Surg* 2004, 39:1261–1267
  28. BOWN MJ, SUTTON AJ, BELL PR, SAYERS RD. A meta-analysis of 50 years of ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 2002, 89:714–730
  29. COTA AM, OMER AA, JAIPERSAD AS, WILSON NV. Elective versus ruptured abdominal aortic aneurysm repair: A 1-year cost-effectiveness analysis. *Ann Vasc Surg* 2005, 19:858–861
  30. HINCHLIFFE RJ, YUSUF SW, MACIEREWICZ JA, MACSWEENEY ST, WENHAM PW, HOPKINSON BR. Endovascular repair of ruptured abdominal aortic aneurysm – a challenge to open repair? Results of a single centre experience in 20 patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001, 22:528–534
  31. HARTSHORNE TC, MCCOLLUM CN, EARNSHAW JJ, MORRIS J, NASIM A. Ultrasound measurement of aortic diameter in a national screening programme. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011, 42:195–199
  32. SVENSJÖ S, BJÖRCK M, GÜRTELSCHMID M, DJAVANI GIDLUND K, HELLBERG A, WANHAINEN A. Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old Swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease. *Circulation* 2011, 124:1118–1123
  33. LEDERLE FA, JOHNSON GR, WILSON SE, LITTOOY FN, KRUPSKI WC, BANDYK D ET AL. Yield of repeated screening for abdominal aortic aneurysm after a 4-year interval. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern Med* 2000, 160:1117–1121
  34. BRADY AR, THOMPSON SG, FOWKES FG, GREENHALGH RM, POWELL JT; UK SMALL ANEURYSM TRIAL PARTICIPANTS. Abdominal aortic aneurysm expansion: Risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation* 2004, 110:16–21
  35. NAIR N, SARFATI D, SHAW C. Population screening for abdominal aortic aneurysm: Evaluating the evidence against screening criteria. *N Z Med J* 2012, 125:72–83
  36. SVENSJÖ S, MANI K, BJÖRCK M, LUNDKVIST J, WANHAINEN A. Screening for abdominal aortic aneurysm in 65-year-old men remains cost-effective with contemporary epidemiology and management. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2014, 47:357–365
  37. GIARDINA S, PANE B, SPINELLA G, CAFUERI G, CORBO M, BRASSEUR P ET AL. An economic evaluation of an abdominal aortic aneurysm screening program in Italy. *J Vasc Surg* 2011, 54:938–946
  38. GLOVER MJ, KIM LG, SWEETING MJ, THOMPSON SG, BUXTON MJ. Cost-effectiveness of the National Health Service Abdominal Aortic Aneurysm Screening Programme in England. *Br J Surg* 2014, 101:976–982
  39. SADAT U, BOYLE JR, WALSH SR, TANG T, VARTY K, HAYES PD. Endovascular vs open repair of acute abdominal aortic aneurysms – a systematic review and meta-analysis. *J Vasc Surg* 2008, 48:227–236
  40. CHICHEPORTICHE Y, BOURDON PR, XU H, HSU YM, SCOTT H, HESSION C ET AL. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 1997, 272:32401–32410
  41. CHIQUET-EHRISMANN R, CHIQUET M. Tenascins: Regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 2003, 200:488–499
  42. CHIQUET-EHRISMANN R, TANNHEIMER M, KOCH M, BRUNNER A, SPRING J, MARTIN D ET AL. Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J Cell Biol* 1994, 127:2093–2101
  43. DAWSON J, COCKERILL G, CHOKE E, LOFTUS I, THOMPSON MM. Aortic aneurysms as a source of circulating interleukin-6. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1085:320–323
  44. DAWSON J, COCKERILL GW, CHOKE E, BELLI AM, LOFTUS I, THOMP-



- SON MM. Aortic aneurysms secrete interleukin-6 into the circulation. *J Vasc Surg* 2007, 45:350–356
45. DOMANOVITS H, SCHILLINGER M, MÜLLNER M, HÖLZENBEIN T, JANATA K, BAYEGAN K ET AL. Acute phase reactants in patients with abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 2002, 163:297–302
46. ABDUL-HUSSIEN H, HANEMAAIJER R, KLEEMANN R, VERHAAREN BF, VAN BOCKEL JH, LINDEMAN JH. The pathophysiology of abdominal aortic aneurysm growth: Corresponding and discordant inflammatory and proteolytic processes in abdominal aortic and popliteal artery aneurysms. *J Vasc Surg* 2010, 51:1479–1487
47. AKIRA S, HIRANO T, TAGA T, KISHIMOTO T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J* 1990, 4:2860–2867
48. JONES KG, BRULL DJ, BROWN LC, SIAN M, GREENHALGH RM, HUMPHRIES SE ET AL. Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2001, 103:2260–2265
49. KIMURA T, YOSHIMURA K, AOKI H, IMANAKA-YOSHIDA K, YOSHIDA T, IKEDA Y ET AL. Tenascin-C is expressed in abdominal aortic aneurysm tissue with an active degradation process. *Pathol Int* 2011, 61:559–564
50. LINDHOLT JS, MARTIN-VENTURA JL, URBONAVICIUS S, RAMOS-MOZO P, FLYVBJERG A, EGIDO J ET AL. Insulin-like growth factor I – a novel biomarker of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011, 42:560–562
51. MACKIE EJ, SCOTT-BURDEN T, HAHN AW, KERN F, BERNHARDT J, REGENASS S ET AL. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am J Pathol* 1992, 141:377–388
52. MARTINEZ-PINNA R, RAMOS-MOZO P, MADRIGAL-MATUTE J, BLANCO-COLIO LM, LOPEZ JA, CALVO E ET AL. Identification of peroxiredoxin-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, 31:935–943
53. MUÑOZ-GARCÍA B, MARTÍN-VENTURA JL, MARTÍNEZ E, SÁNCHEZ S, HERNÁNDEZ G, ORTEGA L ET AL. Fn14 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: Modulation by atorvastatin. *Stroke* 2006, 37:2044–2053
54. MIDWOOD KS, OREND G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 2009, 3:287–310
55. ROHDE LE, ARROYO LH, RIFAI N, CREAGER MA, LIBBY P, RIDKER PM ET AL. Plasma concentrations of interleukin-6 and abdominal aortic diameter among subjects without aortic dilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19:1695–1699
56. SATTI J, SOINI Y, POLLANEN R, PÄÄKKÖ P, JUONONEN T. Tenascin expression is associated with a chronic inflammatory process in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1997, 26:670–675
57. AZUMA J, ASAGAMI T, DALMAN R, TSAO PS. Creation of murine experimental abdominal aortic aneurysms with elastase. *J Vis Exp* 2009, 29:pii:1280

*Corresponding author:*

D.N. Moris, 56 Anastasiou Gennadiou street, GR-114 74 Athens, Greece  
e-mail: dimmoris@yahoo.com

.....