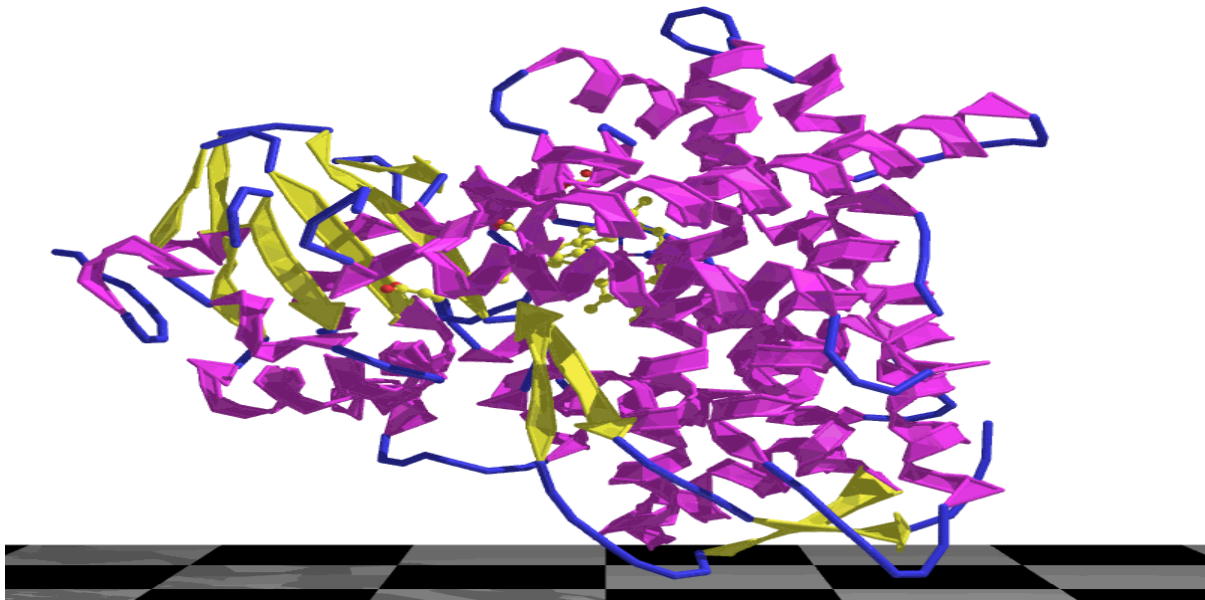


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

*Μελέτη του ρόλου του γονιδίου της συνθετάσης της  
θρομβοξάνης (CYP5A1) σε ασθενείς με Αγγειακά  
Εγκεφαλικά Επεισόδια*



Επιβλέπων Καθηγητής  
Δημήτριος Α. Σπαντίδος  
Διδακτορική Διατριβή  
Μαρία Α. Κιμούλη

Ηράκλειο 2009

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ο καιρός πέρασε και φτάνω στο σημείο, να γράφω την τελευταία σελίδα της διδακτορικής μου διατριβής. Κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, έτυχα της βοήθειας και υποστήριξης πολλών ανθρώπων και για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους μου συμπαραστάθηκαν κατά την εκπόνηση και συγγραφή της διδακτορικής αυτής εργασίας.

Πρώτα απ' όλους, ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Δημήτριο Σπαντίδο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική και ηθική υποστήριξη του καθ' όλη την πορεία του πονήματος, δίνοντας μου την ευκαιρία να γνωρίσω έναν ιδιαίτερο χώρο της επιστήμης την έρευνα. Όλως ιδιαίτερως ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ Γ. Σουρβίνο για την τεχνική υποστήριξη και θεωρητική καθοδήγηση που με τόση υπομονή παρείχε κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της διατριβής. Για την συμβολή του στην συλλογή του ανθρώπινου υλικού της διατριβής, την επιστημονική καθοδήγηση και την υλικοτεχνική υποστήριξη, ευχαριστώ θερμά τον Λέκτορα κ Σπύρο Μυγιάκη. Στο σημείο αυτό, νοιώθω την υποχρέωση να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ.Αμοιρίδη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μ. Αλεξανδράκη.

Πολλές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Βίκτωρα Γκούρβα που με τις συμβουλές, τις ιδέες και τις παρατηρήσεις του με υποστήριξε όλο αυτό τον καιρό. Δεν θα πρέπει να ξεχάσω να αποδώσω ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας για την επιτυχή συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα και ιδιαίτερα στους Νίκο Σουλιτζή, Ιωάννα Διαλυνά, Γιάννα Σούφλα, Σταύρο Αποστολάκη, Βούλα Μπαριτάκη, Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο, Δημήτρη Πανουτσόπουλο.....Θα ήθελα να πώ ένα μεγάλο ευχαριστώ στις φίλες μου Αγγελική, Σουζάνα, Πέπυ, Ειρήνη, Γιώτα και Ξένια για τη στήριξη, τη βοήθεια και την συμπαράσταση που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα. Η άριστη συνεργασία με όλα τα μέλη του εργαστηρίου έκανε διδακτικό και ευχάριστο το πέρασμα μου από τον χώρο της βασικής έρευνας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τις τόσες θυσίες που έκανε για να πραγματοποιήσω την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

*Μαρία Κιμούλη*

*Ηράκλειο 2009*

*...Στον άντρα μου,*

*στον Ηλία και στην Εβελίνα*

*και στους γονείς μας.*

## Περιεχόμενα

**Ευχαριστίες**

**Βιογραφικό Σημείωμα**

**Πρόλογος**

**1. Εισαγωγή**

### **1.1. Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια**

- 1.1.1. Συνοπτικές πληροφορίες για την εγκεφαλική λειτουργία
- 1.1.2. Παροδικό Ισχαιμικό Επεισόδιο (Transient Ischemic Attacks - TIAs)
- 1.1.3. Ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο
- 1.1.4. Η ισχαιμία αφορά το καρωτιδικό ή το σπονδυλοβασικό σύστημα;
- 1.1.5. Πρόληψη αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου
  - 1.1.5.1. Πρωτογενής πρόληψη
  - 1.1.5.2. Δευτερογενής πρόληψη

### **1.2. Κυτόχρωμα P450**

- 1.2.1. Τι είναι τα P450s;
- 1.2.2. Βιοχημικές ιδιότητες
- 1.2.3. Τι κάνουν τα P450;
- 1.2.4. Ονοματολογία της υπερ-οικογένειας των P450
- 1.2.5 Εξελικτική Πορεία των CYPs
- 1.2.6. Ο ρόλος κλειδί των P450 στην ανθρώπινη βιολογία και τα ιατρικά θεραπευτικά  
Τα CYPs στον Άνθρωπο
- 1.2.7. TBXAS1 thromboxane A synthase 1 (CYP5A1)
  - 1.2.7.1. Γονιδιακή δομή και πολυμορφισμοί του ανθρώπινου γονιδίου που κωδικοποιεί την συνθετάση της θρομβοξάνης

## **2. Υλικά και μέθοδοι**

### **2.1. Συλλογή Δειγμάτων**

### **2.2. Επεξεργασία δειγμάτων – Μέθοδοι**

2.2.1. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα

2.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

2.2.4. Υλικά και εταιρείες προέλευσης

### **2.3. Στατιστική ανάλυση**

## **3. Αποτελέσματα**

## **4. Συζήτηση**

## **5. Συμπεράσματα**

## **6. Βιβλιογραφία**

## **Μέρος δεύτερο**

*Παράλληλο ερευνητικό έργο. Τίτλος: <<Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα CX3CR1 της FKN σε ασθενείς με συμπτωματική κα μη συμπτωματική στένωση των καρωτίδων>>*

## **Πρόλογος**

### **1. Εισαγωγή**

**1.1. Αθηροσκλήρωση-χρόνια φλεγμονή και παθογένεση των ισχαιμικών συμβαμάτων**

**1.2. Χημοκίνες και αθηροσκλήρωση**

1.2.1. Οι CX3C χημοκίνες και αθηροσκλήρωση

1.2.2. Πολυμορφισμοί στο σύστημα χημοκινών του υποδοχέα CX3CR1 της FKN

## **2. Υλικά και μέθοδοι**

**2.1. Συλλογή δειγμάτων**

**2.2. Επεξεργασία δειγμάτων –Μέθοδοι**

### **2.3. Στατιστική ανάλυση**

**3. Αποτελέσματα**

**4. Συζήτηση**

**5. Βιβλιογραφία**

**Δημοσιευμένα άρθρα**

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΚΙΜΟΥΛΗ Α. ΜΑΡΙΑ, MD

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

- Όνομα: **Κιμούλη Α. Μαρία**
- Ημερομηνία γέννησης: 26/04/1973
- Τόπος διαμονής : Πειραιάς
- Υπηκοότητα: Ελληνική
- Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος με δύο παιδιά
- Διεύθυνση οικίας: Νέστωρος 12Α, Νίκαια 184 51 Πειραιάς
- Τηλέφωνα επικοινωνίας : **6942429329**, 210-4931396
- E- mail: **kimoulimaria @ gmail.com**

### ΣΠΟΥΔΕΣ

#### ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΟΥΚΟΥΡΕΣΤΙΟΥ «CAROL DAVILA»

Βουκουρέστι: (1991-1997).

Πτυχίο: Ιατρικής (Σεπτέμβριος 1997) με αριθμό 68734/34/22/9/97.

Βαθμός: «Άριστα».

#### ΙΣΟΤΙΜΙΑ ΤΙΤΛΟΥ ΑΠΟ ΔΙ.ΚΑ.Τ.Σ.Α.

με αριθμό πράξης 10/28/1999, Αθήνα (14/1/1999).

### ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

**ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΤΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ.** Οκτώβριος 2005, υπό αριθμό απόφασης Υ9824/10/10/05

Γενικό Νοσοκομείο Τζάνειο Πειραιά για ειδίκευση στην Βιοπαθολογία.  
Κέντρο Υγείας Αταλάντης. Αταλάντη Φθιώτιδας: (1999-2000). Υποχρεωτική υπηρεσία  
υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας. Διάρκεια: Δώδεκα μήνες.

**Γενικό Νοσοκομείο Λαμίας.** Λαμία Φθιώτιδας: (1999). Ειδίκευση υποχρεωτική στα Τμήματα: Χειρουργικής, Παθολογίας, Καρδιολογίας, στα πλαίσια της υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου. Διάρκεια: Τρεις μήνες.

#### **ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ**

**Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας-Πειραιά <<ΑΓΙΟΣ ΠΑΝΤΕΛΗΜΩΝ>>** Επιμελήτρια Β Ιατρικής Βιοπαθολογίας, θέση κλάδου γιατρών Ε.Σ.Υ. Διάρκεια από 23/06/08 έως σήμερα.

**Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών ΑΣΚΛΗΠΕΙΟ ΒΟΥΛΑ.** Κάλυψη θέσης ειδικευμένου επικουρικού Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Διάρκεια από 1-06-07 έως 30-05-08.

**Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου ΒΕΝΙΖΕΛΕΙΟ-ΠΑΝΑΝΕΙΟ.** Κάλυψη θέσης ειδικευμένου επικουρικού Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Διάρκεια από 3-04-06 έως 3-04-07.

#### **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Ολοκλήρωση Διδακτορικής Διατριβής με τίτλο:

**«Μελέτη του ρόλου του γονιδίου της συνθετάσης της θρομβοξάνης (CYP5A1) σε ασθενείς με Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια».**

Διδακτορική φοιτήτρια στο εργαστήριο **Κλινικής Ιολογίας**, στο Πανεπιστήμιο Ιατρικής της Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιολογίας Δ.Α. Σπαντίδου.

#### **ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΟ ΕΡΓΟ ΣΕ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ**

Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του **Παγκόσμιου Συνεδρίου “9th World Congress on Advances in Oncology”** και **“7th International Symposium on Molecular Medicine”**, Κρήτη, Οκτώβριος 2004.

Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του **Παγκόσμιου Συνεδρίου “13th World Congress on Advances in Oncology”** και **“11th International Symposium on Molecular Medicine”**, Κρήτη, Οκτώβριος 2008.

#### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

M. Kimouli et al, <<**The effect of an exon 12 polymorphism of the human thromboxane synthase (CYP5A1) gene in stroke patients**>>. Med Sci Monit, 2009; 15(1): BR30-35.

M. Kimouli et al, <<**Polymorphisms of Fractalkine Receptor CX3CR1 gene in patients with symptomatic and asymptomatic carotid artery stenosis**>>. Βρίσκεται για revision προς δημοσίευση στο περιοδικό Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. Έχει γίνει δεκτό.

**«Πρωτοπαθής δερματική νοκαρδίωση με σύστοιχη λεμφαγγειίτιδα και λεμφαδενίτιδα»** στο Δελτίο της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, Acta Microbiologica Hellenica. Τόμος



48, Τεύχος 1, Ιανουάριος-Φεβρουάριος 2003. Μικροβιολογικό Εργαστήριο και Β' Χειρουργική Κλινική Γεν. Νοσοκ. Τζάνειο Πειραιά. Δ.Ι. Γιαννέλη, Μ.Α. Κιμούλη, Σ.Ι. Σαφράς, Χ.Α. Νικολοπούλου.

#### **ΣΥΝΕΔΡΙΑ-ΗΜΕΡΙΔΕΣ**

**35<sup>ου</sup> Ετήσιου Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου.** Αθήνα, Μάιος 2009.

**4<sup>ου</sup> Εθνικού Συνεδρίου Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων.** Πολεμικό Μουσείο Αθηνών, Φεβρουάριος 2009.

**9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων και 2<sup>η</sup> Ημερίδα Χημειοθεραπείας.** Αθήνα, Φεβρουάριος 2009.

**9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας.** Αθήνα, Νοέμβριος 2008

**13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine.** Κρήτη, Οκτώβριος 2008

**33<sup>ου</sup> Ετήσιου Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου.** Αθήνα, Μάιος 2007.

**Προγεννητικός έλεγχος και Γενετική προσέγγιση σκελετικών δυσπλασιών.** Κρήτη, Οκτώβριος 2006.

**Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας.** Αθήνα Νοέμβριος 2006.

**12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine.** Κρήτη, Οκτώβριος 2007.

**11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine.** Κρήτη, Οκτώβριος 2006.

**4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας.** Αθήνα, Απρίλιος 2006.

**2<sup>nd</sup> Advances Against Aspergillosis.** Αθήνα, Φεβρουάριος 2006.

**Επιστημονική Διημερίδα «Σακχαρώδης Διαβήτης- Αθηρωμάτωση-Καρδιαγγειακή Νόσος».** Αθήνα, Φεβρουάριος 2006.

**8<sup>th</sup> international symposium on Febrile Neutropenia.** Αθήνα, Ιανουάριος 2006.

**9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γεροντολογίας Γηριατρικής.** Αθήνα, Ιανουάριος 2006. Ημερίδα με θέμα «**Μικροβιολογία Αναερόβιων Λοιμώξεων**». Αθήνα, Ιανουάριος 2006.

**5<sup>η</sup> Διημερίδα Ιογενούς Ηπατίτιδας Β και C.** Αθήνα, Ιανουάριος 2006.

**7<sup>η</sup> Επιστημονική Ημερίδα Λοιμώξεων με θέμα «Ιογενείς Λοιμώξεις».** Αθήνα, Ιανουάριος 2006.

**10<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 8<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine.** Κρήτη, Οκτώβριος 2005.

**Επιστημονική Ημερίδα «Οστεοτομίες Πυέλου και κάτω άκρων»,** που οργανώθηκε από την Ζ' Ορθοπαιδική Κλινική του Γ.Ν. Ασκληπείου Βούλας, Αθήνα, Μάιος 2005.

**2<sup>ου</sup> Εθνικού Συνεδρίου Κλινικής Μικροβιολογίας- 8<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής.** Πολεμικό Μουσείο Αθηνών, Φεβρουάριος 2005.

**5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας.** Αθήνα Νοέμβριος 2004.

**9<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 7<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine.** Κρήτη, Οκτώβριος 2004.

**30<sup>ου</sup> Ετήσιου Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου.** Αθήνα, Μάιος 2004.

**3<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Ιατρικής Βιοπαθολογίας.** Θεσσαλονίκη, Απρίλιος 2004.

**8<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 6<sup>th</sup> International Symposium On Molecular Medicine.** Κρήτη, Οκτώβριος 2003.

**20<sup>ου</sup> Εθνικού Συνεδρίου Μικροβιολογίας-2<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Ιατρικής Βιοπαθολογίας.** Αθήνα, Μάρτιος 2002.

**12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο.** Αθήνα, Νοέμβριος 2001.

**6<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Ιολογίας.** Αθήνα, Μάρτιος 2001.

### ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ-COURSES

- **Advanced Course in Clinical Parasitology.** *ESCMID Postgraduate Technical Workshop* organised by the ESCMID Study Group of Clinical Parasitology and the Laboratoire de Parasitologie, Faculte de Medicine Deniw Diderot, Paris, France, 30-31 March 2009 (συνολικά 18 ώρες).
- Στα πλαίσια του Γου Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης, παρακολούθηση ενέργειας κατάρτισης με τίτλο << **Επιδημιολογία και κλινικοεργαστηριακή διάγνωση παρασιτικών και τροπικών νοσημάτων με χρήση ηλεκτρονικών προγραμμάτων**>>. Συνολικής διάρκειας 30 ωρών. ΕΣΔΥ, Αθήνα Σεπτέμβριος 2008.
- Στα πλαίσια του Γου Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης, παρακολούθηση ενέργειας κατάρτισης με τίτλο << **Χρηστικότητα Η/Υ και προγραμμάτων αυτών στη Διαχείριση δεδομένων Δ. Υγείας. Λοιμώξεις-Μικροβιακή ανοχή**>>. Συνολικής διάρκειας 30 ωρών. ΕΣΔΥ, Αθήνα Σεπτέμβριος 2008.
- Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών-Ιατρική Σχολή-Εργαστήριο Μικροβιολογίας. **Ταχύρρυθμο μετεκπαιδευτικό σεμινάριο του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών**, σε συνεργασία με την Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, την Ελληνική Εταιρεία Ιατρικής Βιοχημείας, την Ελληνική Εταιρεία Εργαστηριακής Αιματολογίας και Αιμοδοσίας και την Ελληνική Εταιρεία Ανοσολογίας. Αθήνα, **Ιανουάριος-Απρίλιος 2005 (διάρκεια 3 μήνες)**.
- «**Υγειονομικός έλεγχος κρουαζιερόπλοιων**». Επιχειρησιακό πρόγραμμα «Υγεία-Πρόνοια» του Γου Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης, από το **Κέντρο Επαγγελματικής Κατάρτισης Γ. Ν. Π. Τζάνειο** με συγχρηματοδότηση του **Ευρωπαϊκού Κοινοτικού Ταμείου και του Υπουργείου Υγείας και Πρόνοιας**. Συνολικής διάρκειας **50 ωρών**, με 32 ώρες θεωρητική κατάρτιση και 18 ώρες πρακτική άσκηση. Αθήνα, Οκτώβριος 2004.
- **2<sup>ου</sup> Εκπαιδευτικού Σεμιναρίου** με θέμα «**Ηλεκτρολυτικές διαταραχές, διαταραχές της ομοιοστασίας του Na και του K**». Αθήνα, Φεβρουάριος 2006.

- Στα πλαίσια του τριημέρου «ΗΜΕΡΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ», στο Πολεμικό Μουσείο Αθηνών, Δεκέμβριος 2005, παρακολούθησα τα εξής Κλινικά Φροντιστήρια:
  - «Συγγενείς Λοιμώξεις».
  - «Σύγχρονες Μέθοδοι στη Διάγνωση των Λοιμώξεων από Ιούς και Παράσιτα».
  - «Σύγχρονες Μέθοδοι στη Διάγνωση των Λοιμώξεων από Βακτήρια και Μύκητες».
  - «Λοιμώξεις από GRAM(+) κόκκους και Θεραπευτική Προσέγγιση».
  - «Ζωνόσοι».
- Στα πλαίσια του 2<sup>ου</sup> Εθνικού Συνεδρίου Κλινικής Μικροβιολογίας και 8<sup>ου</sup> Πανελλήνιου Συνεδρίου Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, στο Πολεμικό Μουσείο Αθηνών, Φεβρουάριος 2005, παρακολούθησα «**Συστηματικές Μυκητιασικές Λοιμώξεις**».
- Στα πλαίσια του τριημέρου «ΗΜΕΡΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ», στο Πολεμικό Μουσείο Αθηνών, Δεκέμβριος 2003, παρακολούθησα τα εξής Κλινικά Φροντιστήρια:
  - «**Η Εργαστηριακή Προσέγγιση των Επιπολής και Δέρματος**».
  - «**Γενικές Γνώσεις Ιολογίας**».
  - «**Οροδιάγνωση των Ιώσεων**».
  - «**Αντιβιοτικά- Φαρμακοκινητική-Φαρμακοδυναμική**».
  - «**Ασφάλεια στο Εργαστήριο της Κλινικής Μικροβιολογίας**».
- Στα πλαίσια του 20<sup>ου</sup> Εθνικού Συνεδρίου Μικροβιολογίας-2<sup>ου</sup> Πανελλήνιου Συνεδρίου Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα, Μάρτιος 2002, παρακολούθησα «**Η Συμβολή της Μοριακής Βιολογίας στους τέσσερεις Εργαστηριακούς κλάδους**».
- Πιστοποιητικό παρακολούθησης in the 7<sup>th</sup> **Athens International Postgraduate Course on Colorectal Cancer Today** από το International Postgraduate School of the IGSC and the Italian Society of Surgery. Αθήνα, Νοέμβριος 1999.

#### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

**Trends in the Incidence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nosocomial Bloodstream Infections in a Tertiary Care Hospital in Greece: a Three-Year Study**

ESCMID, Helsinki, May, 2009.

**ΕΜΠΕΙΡΙΚΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΙΜΙΑ ΤΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ** 35ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 2009.

**Απομόνωση μικροβίων και αντοχή στα αντιβιοτικά σε άτομα με και χωρίς Σακχαρώδη Διαβήτη με λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος.** 11ο Ετήσιο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, Αλεξανδρούπολη, Μάρτιος 2009.

**Επίπτωση και in vitro ευαισθησία στελεχών Candida που απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες ασθενών.** 4<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων. Αθήνα Φεβρουάριος 2009.

**Συχνότητα αποικισμού ενδαγγειακών καθετήρων στη ΜΕΝ Γενικού Νοσοκομείου** 4<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων. Αθήνα Φεβρουάριος 2009.

**Βακτηριαμία σε πρόωρα νεογνά συσχετιζόμενη με ενδαγγειακούς καθετήρες** 4<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων. Αθήνα Φεβρουάριος 2009.

**Αντοχή στα αντιβιοτικά στελεχών σταφυλοκόκκου από ρινική φορεία.** 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνεδρίου Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αθήνα, Απρίλιος 2006.

**The contribution of IgG Avidity in the immunodiagnosis of CMV infection** 7<sup>th</sup> European Congress of Chemotherapy and Infection, Florence, Italy, October 19-22, 2005.

**Resistance patterns of staphylococci in nasal carriage** 7<sup>th</sup> European Congress of Chemotherapy and Infection, Florence, Italy, October 19-22, 2005.

**Community-acquired methicillin-resistant S. aureus nasal carriage: prevalence and risk factors.** 15<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark, 2-5 April 2005.

**Μικροβιακή χλωρίδα της ρινικής κοιλότητας σε ασθενείς της κοινότητας κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο.** 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων, 18-20 Φεβρουαρίου 2005, Αθήνα.

**Antimicrobial resistance of tracheobronchial aspiration isolates in ICU- patients.** 14<sup>th</sup> Mediterranean Congress of Chemotherapy & 3rd Pancyprian Congress of Chemotherapy & Infectious Diseases, Limasol, Cyprus, 25-28 November 2004.

**Association between body mass index and Hypercoagulable Status in Diabetic Patients.**  
*13<sup>th</sup> European Congress on Obesity, Prague, May 2004.*

**Επίδραση του είδους της θεραπευτικής αγωγής στον Σακχαρώδη Διαβήτη στα επίπεδα της Ομοκυστεΐνης.** *30<sup>ο</sup> Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 27 Απριλίου-1 Μαΐου 2004, Αθήνα.*

**Αποτελεί η Ομοκυστεΐνη παράγοντα κινδύνου για μακροαγγειοπαθητική νόσο στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II;** *30<sup>ο</sup> Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 27 Απριλίου-1 Μαΐου 2004, Αθήνα.*

**Υπάρχει σχέση μεταξύ της αντίστασης στην ενεργοποιημένη Πρωτεΐνη C και της εμφάνισης μικροαγγειακών επιπλοκών σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II;**  
*30<sup>ο</sup> Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 27 Απριλίου-1 Μαΐου 2004, Αθήνα.*

## **ΜΕΛΟΣ**

Ιατρικός Σύλλογος Πειραιά.

Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία,

Εταιρεία Κλινικής Μικροβιολογίας και Εργαστηριακής Διαγνωστικής,

Ελληνική Μυκητολογική Εταιρεία.

Ελληνική Εταιρεία Ιατρικής Βιοχημείας.

## **Η/Υ**

Windows XP, Ms Word XP, Ms Excel XP, Ms Power Point XP, Ms Access XP and Internet, με πιστοποιητικά εκπαίδευσης:

## **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Αγγλικά: Άριστη γνώση First Certificate

Γαλλικά: Άριστη γνώση Certificat

Ρουμάνικα: Άριστη γνώση

## **Πρόλογος**

Τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια αποτελούν ένα ιδιαίτερο συχνό και σημαντικό πρόβλημα υγείας, κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες, καθώς αποτελούν την τρίτη σε συχνότητα αιτία θανάτου και μια από τις πιο συνηθισμένες αιτίες αναπηρίας. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν επιτακτική την ανάγκη όχι μόνο έγκαιρης διάγνωσης, αντιμετώπισης και αποτελεσματικής πρόληψης αλλά και συνεχούς επιστημονικής έρευνας και μελέτης με σκοπό τη γνώση νέων δεδομένων σε κλινικό, θεραπευτικό αλλά και μοριακό επίπεδο, που θα προσδώσει νέα στοιχεία και δεδομένα για την παθογένεια της πολυπαραγοντικής αυτής νόσου. Στο 80% των περιπτώσεων πρόκειται για ισχαιμικά ΑΕΕ, κυριότερος μηχανισμός δημιουργίας των οποίων είναι τοπική απόφραξη εγκεφαλικού αγγείου από δημιουργία θρόμβου *in situ* ή (συνηθέστερα) κατόπιν αποκόλλησης τμήματος αθηρωματικής πλάκας των αρτηριδίων. Τα αιμοπετάλια είναι τα κύτταρα του αίματος που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια σχηματισμού ενός θρόμβου. Όταν το τοίχωμα ενός αγγείου υποστεί τραυματισμό ή μία προϋπάρχουσα εντός του αγγειακού αυλού αθηρωματική πλάκα ραγεί, τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια αθροίζονται στην περιοχή και προσκολλώνται στο αγγειακό τοίχωμα, αλλά και συγκολλώνται μεταξύ τους. Ταυτόχρονα δεσμεύουν στην επιφάνεια τους παράγοντες πήξεως του αίματος και πυροδοτούν την δημιουργία λευκού αιμοπεταλιακού θρόμβου στη περιοχή, ώστε να σταματήσει η αιμορραγία. Έτσι, η συγκόλληση των αιμοπεταλίων με το αγγειακό

τοίχωμα αποτελεί το πρωταρχικό και απαραίτητο βήμα για τη δημιουργία θρόμβου μετά την αγγειακή βλάβη.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε τη συνθετάση της θρομβοξάνης (*CYP5A1*) η οποία είναι ένα μέλος της οικογένειας του κυτοχρώματος P450, που καταλύει την μετατροπή της προσταγλανδίνης H<sub>2</sub> σε θρομβοξάνη A<sub>2</sub>, έναν ισχυρό μεσολαβητή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και της αγγειοσυστολής, παράγοντα κινδύνου σημαντικό στην παθογένεια της νόσου. Η θρομβοξάνη A<sub>2</sub> ευνοεί την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την αγγειοσύσπαση. Έχει εκ διαμέτρου αντίθετη βιολογική δράση με την προστακυκλίνη, η οποία αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων στην αγγειακή πληγή και έχει αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες. Οι δύο αυτές δραστικές ουσίες προέρχονται από κοινή μεταβολική οδό: με τη δράση της φωσφορολιπάσης C ελευθερώνεται από τα μεμβρανικά φωσφορολιπίδια αραχιδονικό οξύ που παρουσία του ενζύμου κυκλοοξυγενάση μετατρέπεται σε προσταγλανδίνη. Στη συνέχεια η κοινή μεταβολική οδός αλλάζει, οδηγώντας στο σχηματισμό θρομβοξάνης A<sub>2</sub> στο αιμοπετάλιο και προστακυκλίνης στο ενδοθηλιακό κύτταρο, μετά την παρέμβαση ειδικών συνθετασών. Σε περίπτωση τραυματισμού αγγείου μειώνεται τοπικά η παραγωγή της συνθετάσης της προστακυκλίνης και προάγεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς υπερισχύει η δράση της θρομβοξάνης A<sub>2</sub>.

Το *CYP5A1* είναι το μοναδικό έως σήμερα γνωστό μέλος της ομάδας 5 της υπεροικογένειας του κυτοχρώματος P450. Με βάση τα τρέχοντα δεδομένα, είναι το μοναδικό

ένζυμο του συστήματος P450 που συμμετέχει στο μεταβολικό μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος. Ο πλήρης μηχανισμός με τον οποίο η πρωτεΐνη *CYP5A1* επιτελεί τη λειτουργία της, καθώς και ο ακριβής τρόπος σύνδεσης με τα υποστρώματα, δεν είναι ακόμη επακριβώς γνωστοί. Γενετικοί πολυμορφισμοί σε κωδικές περιοχές του 12 εξωνίου του γονιδίου *CYP5A1* έχουν ήδη περιγραφεί σε Καυκάσιους πληθυσμούς. Εξετάσαμε την παρουσία των αλληλομορφικών μορφών του εξωνίου 12 του *CYP5A1* σε Έλληνες ασθενείς με ιστορικό με ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια και/ή με Παροδικά Ισχαιμικά Επεισόδια ΤΙΑ, όπως επίσης και αντίστοιχα σε κλινικά δεδομένα υγείας μάρτυρες, με ελεύθερο σχετικό ιστορικό. Κλινικοεπιδημιολογικά δεδομένα συμπεριλαμβανομένης της γεωγραφικής περιοχής προέλευσης, την παρουσία παραγόντων κινδύνου για αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, και της χρήσης ασπιρίνης ή άλλων αντι-αιμοπεταλικών παραγόντων την ώρα της αγγειακής επίθεσης, ήταν διαθέσιμα για όλα τα δείγματα.

Η έκφραση των αλληλόμορφων του *CYP5A1* στην μελέτη μας δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες. Η επίπτωσή του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου *CYP5A1\*9* μεταξύ των ασθενών από την Κρήτη ήταν χαμηλότερη σε σχέση με την επίπτωσή του στους ασθενείς από την Ηπειρωτική Ελλάδα. Ανάμεσα στους ασθενείς με ΑΕΕ, η παρουσία του wild-type *CYP5A1\*1* αλληλόμορφου ήταν πιο συχνή στους υπέρτασικούς και λιγότερο στους διαβητικούς. Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *CYP5A1\*9* ήταν στατιστικά σημαντικά περισσότερο επικρατές σε αυτούς με επαναλαμβανόμενα ΑΕΕ,



ενώ έπαιρναν ασπιρίνη, συγκριτικά με αυτούς με επιτυχημένη δευτερογενή προφυλακτική θεραπεία με ασπιρίνη. Ομοίως υπήρξε η επικράτηση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στους ασθενείς με ΑΕΕ με ιστορικό προηγούμενου εγκεφαλικοαγγειακού επεισοδίου σε σύγκριση με αυτούς που τους συνέβαινε ελεύθεροι ιστορικού, στατιστικά σημαντικό. Η κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων δεν διέφερε μεταξύ των υπο-τύπων ισχαιμικού ΑΕΕ της μελέτης μας. Αναφορικά με τους τύπους ΑΕΕ, το μεταλλαγμένο *CYP5A1\*9* ήταν επικρατέστερο σε ασθενείς με νόσο μικρών αγγείων και λιγότερο σε αυτούς με ΤΙΑ και νόσο μεγάλων αγγείων, αλλά χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να δοθούν νέα δεδομένα σε μοριακό επίπεδο στην παθογένεια των ΑΕΕ. Η λειτουργική σημασία των πολυμορφισμών του *CYP5A1* δεν είναι έως τώρα σαφής, καθώς άλλωστε μόλις πρόσφατα αυτοί αναγνωρίστηκαν. Οι γενετικές μελέτες των πολυμορφισμών στα εξώνια του γονιδίου *CYP5A1* θα διευκρινίσουν περαιτέρω το ρόλο αυτού του ενζύμου στην παθογένεση των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων.

## **1. Εισαγωγή**

### **1.1. Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια**

Με τον όρο Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο (ΑΕΕ) χαρακτηρίζεται η δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, που έχει αιφνίδια εγκατάσταση και οφείλεται σε διαταραχή των εγκεφαλικών αγγείων ή της αιμάτωσης του εγκεφάλου. Τα ΑΕΕ αποτελούν την τρίτη αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες, μετά τις καρδιακές νόσους και τις νεοπλασίες. Είναι επίσης μία από τις συχνότερες αιτίες αναπηρίας, με πολύ σοβαρές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις. Εμφανίζονται συχνότερα σε άτομα άνω των 55 ετών και η συχνότητά τους αυξάνει με την πάροδο της ηλικίας. Μπορεί όμως να προσβληθεί όλο το φάσμα των ηλικιών. Είναι πιο συνήθη στους άνδρες. (Brass LM).

Η εγκεφαλική αιματική ροή, υπό κανονικές συνθήκες, ανέρχεται σε 750 κ.ε. ανά λεπτό ποσότητα που αντιπροσωπεύει το 15% περίπου της καρδιακής παροχής. Η παροχή αίματος στον εγκέφαλο εξασφαλίζεται κατά τα 2/3 από το καρωτιδικό σύστημα και κατά το 1/3 από το σπονδυλοβασικό. Η φαιά ουσία απαιτεί περίπου εξαπλάσια ποσότητα αίματος από τη λευκή.

Οι παράγοντες που ρυθμίζουν την εγκεφαλική ροή διακρίνονται σε εξωκρανιακούς και σε ενδοκρανιακούς. Στους εξωκρανιακούς παράγοντες περιλαμβάνονται η συστηματική αρτηριακή πίεση, η καρδιαγγειακή λειτουργία, η γλοιότητα του αίματος και η περιεκτικότητά του σε οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Εφόσον οι διακυμάνσεις των παραγόντων αυτών

περιορίζονται στα ευρύ φυσιολογικά όρια, δεν προκαλείται διαταραχή της εγκεφαλικής αιματικής ροής.

Οι ενδοκρανικοί παράγοντες ρύθμισης της εγκεφαλικής αιματικής ροής είναι κατά πρώτο ρόλο η ανατομική κατάσταση των αγγείων του εγκεφάλου. Η αρτηριοσκλήρυνση των εγκεφαλικών αγγείων προκαλεί αύξηση των αντιστάσεων με επακόλουθη μείωση της αιματικής ροής. Επίσης η ενδοκράνια πίεση της οποίας η αύξηση προκαλεί αύξηση της φλεβικής πίεσης, με συνέπεια τη μείωση της εγκεφαλικής αιματικής ροής. Λόγος πρέπει να γίνει και για την αυτορρύθμιση της εγκεφαλικής κυκλοφορίας. Με τον όρο αυτό περιγράφεται η ικανότητα των εγκεφαλικών αγγείων να προσαρμόζονται στις μεταβολές της συστηματικής κυκλοφορίας, της οποίας η προσαρμογή επιτυγχάνεται με την αυξομείωση του τόνου των λείων μυικών ινών των εγκεφαλικών αρτηριών. Αυτή επέρχεται είτε ως απευθείας απάντηση στη μεταβολή της αρτηριακής πίεσης (μυογενής τόνος), είτε μέσω ερεθισμού του φυτικού νευρικού συστήματος (νευρογενής τόνος), είτε ως απάντηση σε μεταβολές συστηματικές ή τοπικές της χημικής σύστασης του αίματος (οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, γαλακτικό οξύ). Με τους μηχανισμούς αυτούς ο εγκέφαλος είναι σε θέση να αντιμετωπίσει παθολογικές καταστάσεις όπως συστηματική αρτηριακή υπέρταση (με αντιρροπιακή αγγειοσύσπαση) ή αύξηση της περιεκτικότητας του αίματος σε διοξείδιο του άνθρακα ή γαλακτικό οξύ (με αγγειοδιαστολή).

Επομένως για να λειτουργήσουν σωστά, τα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου, πρέπει να τους παρέχεται συνεχώς αίμα, οξυγόνο και γλυκόζη (σάκχαρο του αίματος). Αν αυτή η παροχή ελαττωθεί, σε μέρη του εγκεφάλου θα διαταραχθεί η φυσιολογική λειτουργία. Αν η ανεπαρκής παροχή είναι μεγάλη ή διαρκέσει, τα εγκεφαλικά κύτταρα βλάπτονται ανεπανόρθωτα. Επειδή η κίνηση και η λειτουργία των διαφόρων μελών του σώματος ελέγχεται από αυτά τα κύτταρα, αυτά επηρεάζονται επίσης. Τα συμπτώματα που θα παρουσιάσει ο ασθενής θα εξαρτηθούν από το ποιο μέρος του εγκεφάλου επηρεάζεται (Ράπτης Σ, 1996), (Λουκόπουλος και συνεργάτες, 1998).

Τα εγκεφαλικά επεισόδια κοστίζουν αρκετά στην οικονομία της υγείας αλλά και κοινωνικά, καθώς απαιτούνται τεράστια ποσά για τους ασθενείς και τις οικογένειές τους. Το κόστος στην οικονομία των ΗΠΑ -σε όρους ιατρικούς και χαμένο εισόδημα- φτάνει τα 25 δις \$ κάθε χρόνο (Kidwell CS et al, 2001). Τα εγκεφαλικά επεισόδια σχετίζονται στενά με καρδιακές παθήσεις. Οι καρδιακές προσβολές (έμφραγμα του μυοκαρδίου), όπως και τα εγκεφαλικά επεισόδια προκαλούνται από διαταραχές στα αγγεία του αίματος. Μοιράζονται πολλούς από τους ίδιους παράγοντες κινδύνου και τροποποίηση αυτών μπορεί να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου. Πολλές από τις θεραπείες που χρησιμοποιούνται για καρδιακές ασθένειες δίνονται επίσης ως θεραπεία για μερικούς τύπους εγκεφαλικών επεισοδίων. Τέλος, άτομα που έχουν ήδη εμφανίσει στεφανιαία νόσο είναι σε μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν εγκεφαλικό επεισόδιο και αντίστροφα (Adams R et al, 2001).

Αν από την αρχική εκτίμηση του ασθενούς διαπιστωθεί η ύπαρξη συμπτωμάτων και σημείων οξείας εγκεφαλικής δυσλειτουργίας και εφόσον, από τον βασικό κλινικο-εργαστηριακό έλεγχο δεν προκύπτουν δεδομένα που να στηρίζουν την πιθανότητα ύπαρξης άλλης νόσου, η διαφοροδιαγνωστική μας σκέψη θα πρέπει οπωσδήποτε να περιλάβει αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ιδιαίτερα όταν συνυπάρχουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω στοιχεία (Adams R et al, 2001):

1) από την εξέταση:

- εστιακή σημειολογία
- αρτηριακή υπέρταση
- καρδιακή νόσος (αρρυθμίες, φυσήματα, ισχαιμία)
- αγγειακή νόσος (φυσήματα καρωτίδων, διαταραχή περιφερικών σφύξεων)

2) από το ιστορικό:

- αιφνίδια εισβολή
- καρδιακή νόσος (αρρυθμίες, ισχαιμία, έμφραγμα, βαλβιδοπάθειες, ενδοκαρδίτις)
- αρτηριακή υπέρταση
- σακχαρώδης διαβήτης
- αγγειίτιδες (κολλαγονώσεις, σύφιλις)
- προηγούμενο ιστορικό αγγειακών επεισοδίων
- οικογενειακό ιστορικό αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων

Η διαφορική διάγνωση θα πρέπει να λάβει υπόψη δύο βασικά στοιχεία, την **εντόπιση της βλάβης** και τον **χρόνο εγκατάστασής** της (Adams R et al, 2001).

Η οξεία εγκεφαλική ισχαιμία διακρίνεται, ανάλογα με την ανατομική έκταση της βλάβης σε **εστιακή** και **σφαιρική ή διάχυτη**. Στην πρώτη περίπτωση η ισχαιμία περιορίζεται στην περιοχή άρδευσης συγκεκριμένου αρτηριακού κλάδου, ενώ στην περίπτωση της διάχυτης η διαταραχή αφορά ολόκληρο τον εγκέφαλο. Η απόφραξη του αρτηριακού κλάδου είναι δυνατό να επέλθει ως αποτέλεσμα είτε θρόμβωσης είτε εμβολής. Η θρόμβωση οφείλεται κατά κανόνα, σε αθηρωματική νόσο των μεγάλων και μέσου εύρους αγγείων του εγκεφάλου. Το παθολογοανατομικό υπόστρωμα της αθηρωματικής νόσου είναι οι αθηρωματικές πλάκες, οι οποίες αποτελούν σημεία σχηματισμού θρόμβων, με αποτέλεσμα τη σταδιακή στένωση του αυλού του αγγείου και εν τέλει την πλήρη απόφραξή του.

Ο σπουδαιότερος παράγων κινδύνου για την ανάπτυξη αθηρωματικής νόσου είναι η αρτηριακή υπέρταση. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες κινδύνου είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπερχολιστερολαιμία, το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η λήψη αντισυλληπτικών και η γενετική προδιάθεση. Συνηθισμένα αίτια εστιακής εγκεφαλικής ισχαιμίας, εκτός των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, είναι οι φλεγμονώδεις βλάβες των αγγείων (κροταφική αρτηρίτιδα, οζώδης πολυαρτηρίτιδα, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος), ινομυωματώδης δυσπλασία, θρόμβωση εγκεφαλικών φλεβών, ρευματική νόσος, αρρυθμίες, ενδοκαρδίτιδες, έμφραγμα,

προσθετικές βαλβίδες, θρομβοκυττάρωση, πολυκυτταραιμία, δρεπανοκυτταρική αναιμία και καταστάσεις υπερπηκτικότητας του αίματος.

Συνήθως η διάγνωση μιας εστιακής βλάβης δεν είναι δυσχερής. Ο άμεσος παρακλινικός έλεγχος θα πρέπει να περιλαμβάνει γενική αίματος, ΤΚΕ, σάκχαρο αίματος, ουρία και κρεατινίνη αίματος, ηλεκτρολύτες ορού, ορολογικό έλεγχο για σύφιλη, γενική ούρων, ηλεκτροκαρδιογράφημα και αξονική τομογραφία εγκεφάλου. Αναλόγως των ευρημάτων προχωράμε σε αρτηριογραφία των αγγείων του εγκεφάλου, ηλεκτροεγκεφαλογράφημα, οσφυονωτιαία παρακέντηση, μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και τελευταία σε PET scan ή SPECT scan.

Στη διάχυτη εγκεφαλική βλάβη, η οποία αντιπροσωπεύει το 10% περίπου του συνόλου των οξέων ΑΕΕ, τα συμπτώματα εξαρτώνται από τη βαρύτητα και τη διάρκεια της ισχαιμίας. Διάχυτη βλάβη συνήθως προκαλούν οι ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες από ρήξη εγκεφαλικής αρτηρίας, διάφορες λοιμώξεις (εγκεφαλίτις, μηνιγγίτις), τοξικές και μεταβολικές διαταραχές, η μικροαγγειοπάθεια του εγκεφάλου και τα εκφυλιστικά νοσήματα. Ο εργαστηριακός έλεγχος είναι πανομοιότυπος με την εστιακού τύπου βλάβη.

Ο **χρόνος εγκατάστασης** διαχωρίζει την προσβολή του νευρικού συστήματος σε **οξεία, υποξεία** και **χρόνια**. Οξεία εγκατάσταση (εντός λεπτών) εμφανίζουν, εκτός των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, οι κακώσεις, οι τοξικές και μεταβολικές διαταραχές, η ημικρανία και τα λαβυρινθικά σύνδρομα. Υποξεία εγκατάσταση (εντός ημερών) εμφανίζουν οι

λοιμώξεις, η σκλήρυνση κατά πλάκας και ορισμένες επιπλοκές κατώσεων (υποξεία αιματώματα). Τέλος χρόνια εγκατάσταση εμφανίζουν τα νεοπλάσματα, τα χρόνια αιματώματα, η μικροαγγειοπάθεια εγκεφάλου και τα εκφυλιστικά νοσήματα (πίνακας 1.1.).

**Πίνακας 1.1.**

<b>ΒΛΑΒΗ ΚΝΣ</b>	<b>ΟΞΕΙΑ (λεπτά)</b>	<b>ΥΠΟΞΕΙΑ (ώρες-ημέρες)</b>	<b>ΧΡΟΝΙΑ (εβδομάδες-μήνες)</b>
<b>ΕΣΤΙΑΚΗ</b>	ΑΕΕ, κατώσεις, ημικρανία, λαβυρινθικά σύνδρομα	Σκλήρυνση κατά πλάκας, αιματώματα, αποστήματα	Νεοπλάσματα, χρόνια αιματώματα
<b>ΔΙΑΧΥΤΗ</b>	Υπαραχνοειδής	Λοιμώξεις	Μικροαγγειοπάθεια



	αιμορραγία, τοξικές και μεταβολικές διαταραχές		εγκεφάλου, εκφυλιστικές νόσοι
--	--	--	-------------------------------

Έχοντας καταλήξει ότι η πιο πιθανή διάγνωση είναι το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, θα πρέπει να τονιστεί ότι ο ασθενής χρειάζεται συχνή και συστηματική παρακολούθηση, δεδομένου ότι η κατάστασή του είναι δυνατόν να παρουσιάσει αιφνίδια επιδείνωση. Σημεία κινδύνου που επιβάλλουν νοσηλεία του ασθενούς σε μονάδα εντατικής θεραπείας ή

εντατικής θεραπείας ή νευροχειρουργική αντιμετώπιση είναι:

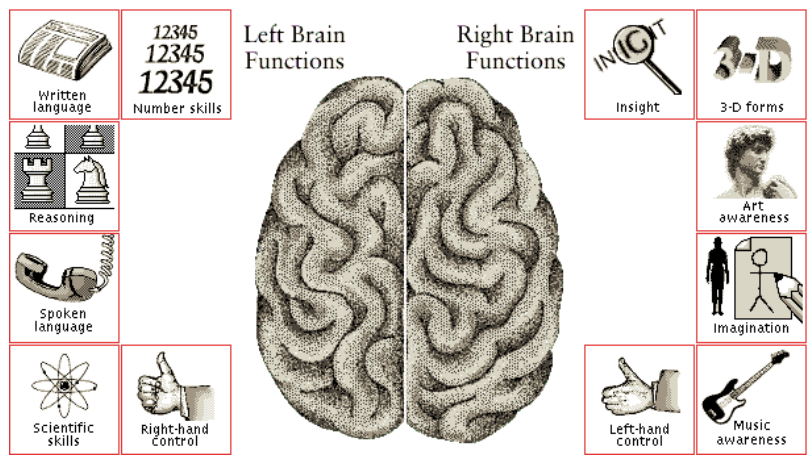
- ετερόπλευρη μυδρίαση
- διαταραχή καρδιακού ρυθμού ή ρυθμού αναπνοής
- επιβάρυνση επιπέδου συνειδήσεως

### **1.1.1. Συνοπτικές πληροφορίες για την εγκεφαλική λειτουργία**

Για να κατανοήσουμε την κλινική εικόνα των ΑΕΕ είναι απαραίτητη η γνώση της λειτουργίας του ανθρώπινου εγκεφάλου. Είναι επίσης, σημαντικό να γνωρίζουμε ότι εκτός από μία σύντομη περίοδο μετά την γέννηση, τα εγκεφαλικά κύτταρα είναι ανίκανα να διαιρεθούν και να σχηματίσουν νέα κύτταρα. Αυτός είναι εν μέρει ο λόγος για τον οποίο ο εγκέφαλος έχει περιορισμένη ικανότητα να επιδιορθωθεί μετά από βλάβη και γιατί η ανάρρωση από εγκεφαλικό επεισόδιο είναι μερική μόνο σε πολλές περιπτώσεις. Για παράδειγμα, ενώ κάποιος που υποφέρει από καρδιακό έμφραγμα μπορεί να χάσει 10% καρδιακού ιστού και να συνεχίζει κανονικά κάθε δραστηριότητά του, απώλεια 10% ιστού από συγκεκριμένα μέρη του εγκεφάλου συνήθως έχει ως αποτέλεσμα μια ανεπανόρθωτη βλάβη ή ακόμα και αναπηρία (Brass LM).

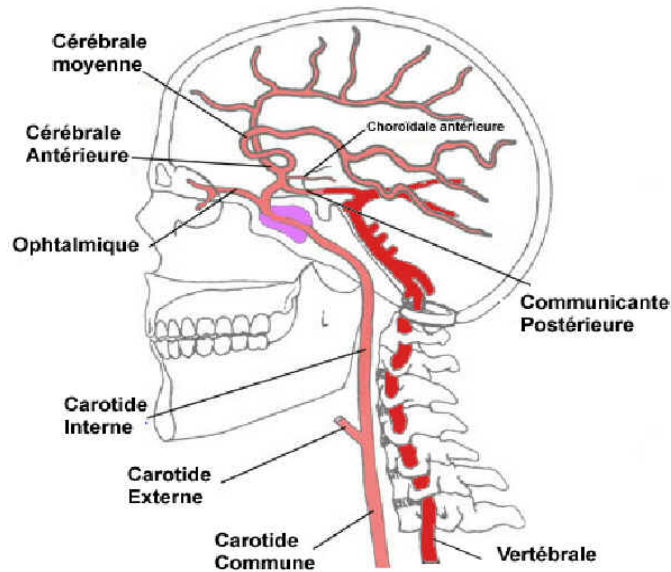
Ο ανθρώπινος εγκέφαλος αποτελείται από νευρικά κύτταρα τους νευρώνες και κάθε νευρώνας μπορεί να συνδέεται σε χιλιάδες άλλα εγκεφαλικά κύτταρα. Έτσι ελέγχονται οι

κινήσεις του σώματος, ερμηνεύονται οι αισθήσεις (ακοή, όραση, αφή, ισορροπία, πόνος, γεύση και οσμή) και μεσολαβούν στην σκέψη και την ομιλία. Διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου ελέγχουν διαφορετικές λειτουργίες (εικόνα 1.1.).



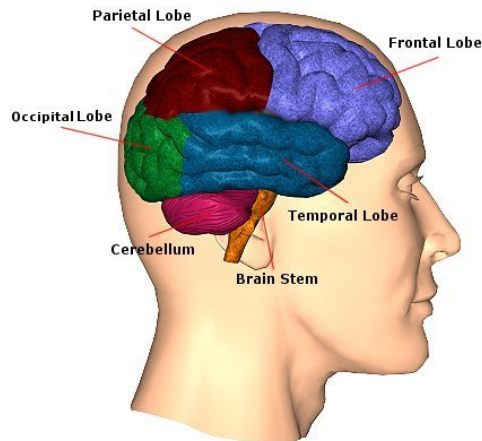
**Εικόνα 1.1.** Διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου ελέγχουν διαφορετικές λειτουργίες (<http://fr.encycarta.msn.com>)

Αν και ο εγκέφαλος αντιπροσωπεύει μόνο το 2% του σωματικού βάρους, χρησιμοποιεί το 25% της παροχής οξυγόνου του σώματος και 70% της γλυκόζης. Αντίθετα με τους μύες, ο εγκέφαλος δεν μπορεί να αποθηκεύσει θρεπτικά συστατικά και έτσι απαιτεί συνεχή παροχή γλυκόζης και οξυγόνου. Αν η παροχή αίματος διακοπεί έστω και για 30 δευτερόλεπτα, ακολουθεί απώλεια των αισθήσεων. Μπορεί να προκληθεί μόνιμη εγκεφαλική βλάβη σε 4 μόλις λεπτά. Ο υψηλός μεταβολικός ρυθμός του εγκεφάλου, η ευαισθησία στις αλλαγές της ροής του αίματος και η εξάρτηση από την συνεχή ροή αίματος, είναι που κάνουν τις εγκεφαλικές βλάβες ιδιαίτερα επικίνδυνες. Η εικόνα 1.2. δείχνει τις πιο σημαντικές αρτηρίες παροχής στον εγκέφαλο (Brass LM).



**Εικόνα 1.2.** Φαίνονται οι μεγαλύτερες αρτηρίες που τροφοδοτούν τον εγκέφαλο. Η καρωτίδα και οι κλάδοι της (πρόσθια εγκεφαλική αρτηρία και μεσαία εγκεφαλική αρτηρία) τροφοδοτούν το πρόσθιο μέρος του εγκεφάλου και το μεγαλύτερο μέρος των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (κορυφή του εγκεφάλου). Οι σπονδυλικές αρτηρίες ενώνονται στο πίσω μέρος του εγκεφάλου σχηματίζοντας την βασική αρτηρία. Αυτές οι αρτηρίες και οι διακλαδώσεις τους εφοδιάζουν το εγκεφαλικό στέλεχος, την παρεγκεφαλίδα και τα πίσω μέρη του εγκεφάλου. (Brass LM).

Ο εγκέφαλος διαιρείται σε τρεις περιοχές: **το εγκεφαλικό στέλεχος, την παρεγκεφαλίδα** και τον τελικό **εγκέφαλο** ή ημισφαίρια(εικόνα 1.3). Το εγκεφαλικό στέλεχος ελέγχει πολλές από τις βασικές λειτουργίες του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της αναπνοής, της μάσησης, της κατάποσης, και τις κίνησης των ματιών. Η παρεγκεφαλίδα όπου βρίσκεται στην ινιακή περιοχή στο πίσω μέρος του εγκεφαλικού στελέχους, είναι υπεύθυνη για το συντονισμό των κινήσεων και την ισορροπία.



**Εικόνα 1.3.** Ο εγκέφαλος διαιρείται σε τρεις περιοχές: το εγκεφαλικό στέλεχος, την παρεγκεφαλίδα και τον τελικό εγκέφαλο. Κάθε πλευρά του εγκεφάλου χωρίζεται περαιτέρω σε τέσσερις λοβούς. ([www.neuroskills.com/brain-content.shtml](http://www.neuroskills.com/brain-content.shtml))

Ο τελικός εγκέφαλος χωρίζεται σε δύο ημισφαίρια, το δεξί και το αριστερό (εικόνα 1.1).

Κάθε ημισφαίριο του εγκεφάλου χωρίζεται σε τέσσερις λοβούς (εικόνα 1.3). Οι πρόσθιοι λοβοί ελέγχουν την κινητική λειτουργία, την σκέψη, και την έκφραση της γλώσσας. Οι κροταφικοί λοβοί συμμετέχουν στην ακοή, τη μνήμη και τη συμπεριφορά. Οι βρεγματικοί λοβοί εξυπηρετούν την αίσθηση και ελέγχουν την κατανόηση της γλώσσας. Οι ινιακοί λοβοί αντιλαμβάνονται και εξυπηρετούν την όραση. Η δεξιά πλευρά του εγκεφάλου ελέγχει τις ικανότητες κατανόησης του χώρου και αναγνώρισης προσώπων, όπως επίσης και μουσικές ικανότητες (Brass LM). Τέλος, βοηθάει στην εστίαση της προσοχής.

### **1.1.2. Παροδικό Ισχαιμικό Επεισόδιο (Transient Ischemic Attacks - TIAs)**

Ένα παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο (TIA) είναι μία εντοπισμένη νευρολογική βλάβη που προκαλείται από ισχαιμία (μειωμένη ροή αίματος), που αποκαθίσταται πλήρως μέσα σε 24

ώρες. Τα περισσότερα διαρκούν μόνο μερικά λεπτά. Οι άνθρωποι που υποφέρουν από TIA συχνά αναρρώνουν χωρίς καμμία υπολειμματική βλάβη ή σύμπτωμα (Brass LM).

Η σημασία των TIA έγκειται στο γεγονός ότι το ένα τρίτο των ασθενών αυτών θα υποστεί αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Τα TIA αντιπροσωπεύουν το 10% όλων των εγκεφαλικών αγγειακών ασθενειών. Τουλάχιστον οι μισοί ασθενείς που υποφέρουν από ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο έχουν αναφέρει ότι είχαν TIA, ενώ πολλοί απ' αυτούς δεν είχαν αναζητήσει καν θεραπεία. Τα TIA επίσης ταυτοποιούν μία ομάδα ατόμων με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρδιακής προσβολής. Είναι αναγκαίο κάθε ασθενής με TIA να επισκεφθεί γιατρό για πλήρη νευρολογικό και καρδιολογικό έλεγχο. Ο προληπτικός έλεγχος και η πρώιμη διάγνωση θα συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου σε αυτή την ομάδα ασθενών.

Τα συμπτώματα των TIA είναι παρόμοια με αυτά του εγκεφαλικού επεισοδίου, αδυναμία και αιμωδίες της μιας πλευράς του σώματος, ανικανότητα ομιλίας ή κατανόησης της γλώσσας ή έλλειψη συντονισμού, εκτός κι αν είναι υποκλινικά. Κάθε συνδυασμός των συμπτωμάτων που περιγράφονται ως εγκεφαλικό επεισόδιο θα μπορούσε να θεωρηθεί TIA (πίνακας 1.2.α).

Ένα κοινό σύμπτωμα των TIA είναι η παροδική μονοφθαλμική τύφλωση, που ονομάζεται επίσης *amaurosis fugax* (πτήση σκότους). Αυτή είναι μία σύντομη διαταραχή ή παραμόρφωση της όρασης στο ένα μάτι, που συχνά περιγράφεται ως θάμβος ή ανομοιομορφία. Η διάγνωση ενός ασθενούς με TIA είναι παρόμοια με αυτή για εγκεφαλικό επεισόδιο. Οι περισσότεροι ασθενείς νοσηλεύονται λόγω της ανησυχίας για συνεπακόλουθο

εγκεφαλικό επεισόδιο και της ανάγκης για άμεση θεραπεία. Οι ασθενείς με χαμηλό κίνδυνο για εγκεφαλικό επεισόδιο και αυτοί των οποίων η γενική ιατρική κατάσταση αποκλείει την εντατική θεραπεία μπορεί να ακολουθήσουν εξω-νοσοκομειακή θεραπεία (Brass LM).

Πρωταρχικά πρέπει να διαφοροδιαγνώσουμε άλλες ασθένειες που μπορεί να μιμηθούν τα TIA (πίνακας 1.2.β). Πολλές από αυτές τις ασθένειες είναι νευρολογικές παθήσεις που μπορεί επίσης να απαιτούν έγκαιρη θεραπεία. Τα περισσότερα TIA προκαλούνται είτε από εμβολή (θρόμβος αίματος) είτε από περιορισμένη ροή αίματος, που συχνά προκαλείται από στένωση της καρωτιδικής αρτηρίας. Τα σύντομα TIA (που διαρκούν λιγότερο από 10 λεπτά) είναι κοινώς σχετιζόμενα με την στένωση της καρωτίδας (στένωση αρτηρίας), ενώ τα TIA μεγαλύτερης διάρκειας (που κρατούν περισσότερο από μία ώρα), προκαλούνται συχνά από εμβολή (Brass LM).

Αν ένα TIA έχει προκληθεί από περιορισμένη ροή αίματος εξαιτίας στένωσης της καρωτιδικής αρτηρίας, μπορεί ο ασθενής να υποβληθεί σε κάποια χειρουργική επέμβαση. Όμως, στην περίπτωση που έχει προκληθεί από θρόμβωση ενδοκαρδιακής προέλευσης, ακόμα κι αν υπάρχει καρωτιδική στένωση, αυτό δεν μπορεί να γίνει (Culebras A et al, 1997).

Πίνακας 1.2.α

**Κοινά προειδοποιητικά συμπτώματα εγκεφαλικού επεισοδίου και παροδικού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΤΙΑ)**

Επειδή τα εγκεφαλικά κύτταρα μπορεί να πεθάνουν πολύ γρήγορα μετά από ένα εγκεφαλικό επεισόδιο, είναι σημαντικό να αναγνωριστούν τα προειδοποιητικά συμπτώματα ενός επικείμενου εγκεφαλικού επεισοδίου ώστε να γίνει γρήγορη άφιξη σε νοσοκομείο:

- Ξαφνική αδυναμία ή μούδιασμα στο πρόσωπο, στο χέρι και στο πόδι στην μία πλευρά του σώματος
- Απώλεια ομιλίας, ή δυσκολία στην ομιλία ή στην κατανόηση λόγου
- Θολούρα ή χάσιμο όρασης, συγκεκριμένα στο ένα μάτι ή στο μισό και των δύο ματιών
- Ξαφνική θολούρα ή διπλή όραση
- Ανεξήγητη ζαλάδα
- Ξαφνική αστάθεια, έλλειψη συντονισμού, δυσκολία στο περπάτημα ή πέσιμο
- Ξαφνικός επώδυνος πονοκέφαλος
- Πρόσφατη αλλαγή προσωπικότητας ή πνευματικών ικανοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας μνήμης

Πίνακας 1.2.β

**Καταστάσεις που μπορούν να μιμηθούν ένα ΤΙΑ**

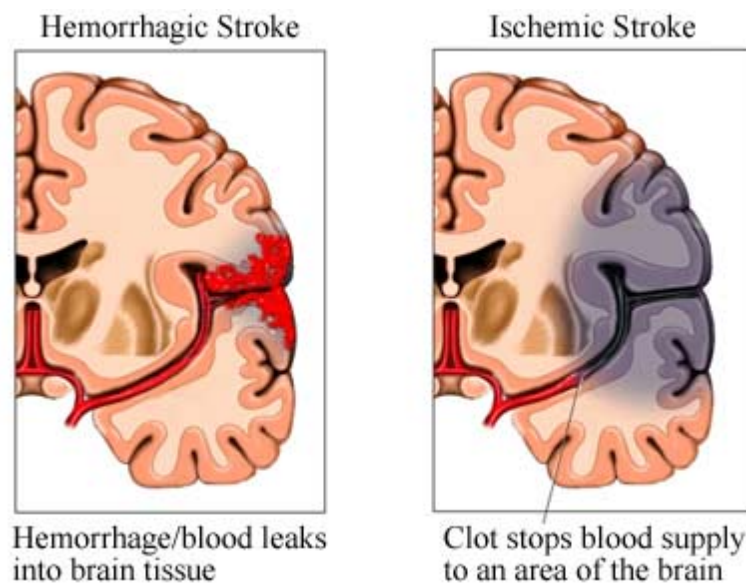
- Ημικρανία
- Υπογλυκαιμία
- Άλλες μορφές εγκεφαλικού επεισοδίου
- Όγκος εγκεφάλου
- Αρτηριοφλεβώδης δυσπλασία
- Πολλαπλή σκλήρυνση
- Αρχόμενη λιποθυμία
- Ορθοστατική υπόταση (χαμηλή πίεση του αίματος)
- Καρδιακή αρρυθμία (ακανόνιστοι παλμοί)
- Αμνησία
- Ναρκοληψία/καταπληξία (διαταραχές υπερβολικής υπνηλίας)
- Ενδοκρανική φλεγμονή (π.χ. εγκεφαλική λοίμωξη)
- Περιοδική παράλυση
- Νευροπάθεια πίεσης (πίεση των νεύρων)
- Ζαλάδα αγνώστου αιτίας
- Άγχος
- Υπεραναιμία
- Λαβυρινθίτιδα

### 1.1.3. Ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο

Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες εγκεφαλικών επεισοδίων: **το ισχαιμικό και το αιμορραγικό** (εικόνα 1.4.). Τα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια προκαλούνται από έλλειψη



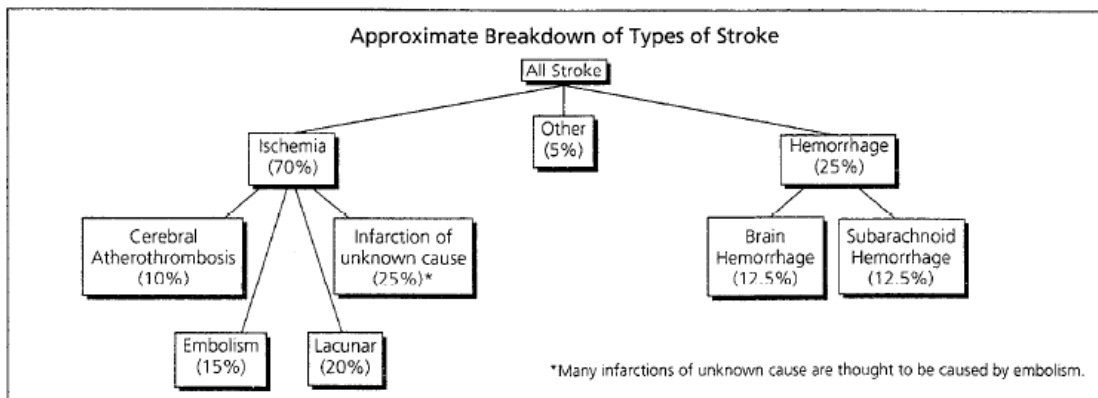
1.4.). Τα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια προκαλούνται από έλλειψη ροής αίματος στον εγκέφαλο και αποτελούν το 70% περίπου όλων των εγκεφαλικών επεισοδίων. Τα αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια προκαλούνται από αιμορραγία στον εγκέφαλο ή σε παρακείμενους ιστούς (Brass LM).



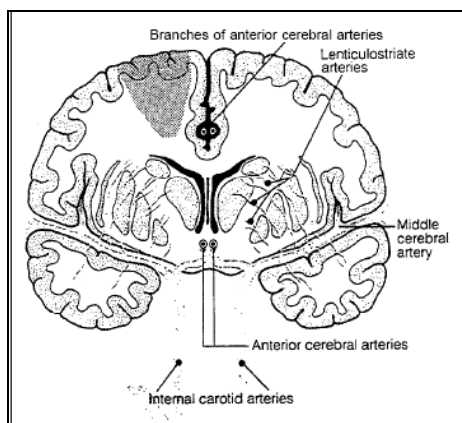
**Εικόνα 1.4.** Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες εγκεφαλικών επεισοδίων: το ισχαιμικό και το αιμορραγικό. Κατά το αιμορραγικό εγκεφαλικό επεισόδιο (αριστερά) το αίμα διαρρέει μέσα στον εγκεφαλικό ιστό. Κατά το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (δεξιά) ένας θρόμβος σταματάει την παροχή αίματος σε μία περιοχή του εγκεφάλου (<http://healthgate.partners.org>)

Στην κατηγορία της ισχαιμίας συγκαταλέγονται διάφορες κατηγορίες εγκεφαλικών επεισοδίων (εικόνα 1.5.). Ένας κοινός τύπος, η **εγκεφαλική αρτηριοθρόμβωση** (ασθένεια της μεγάλης αρτηρίας), προκαλείται από έναν θρόμβο που εμποδίζει την ροή του αίματος στην αρτηρία. Η στένωση οδηγεί σε κατάσταση χαμηλής ροής αναφερόμενη ως **watershed** (**απομακρυσμένου πεδίου**) **ισχαιμία** (εικόνα 1.6.α). Αν η έλλειψη οξυγόνου έχει ως

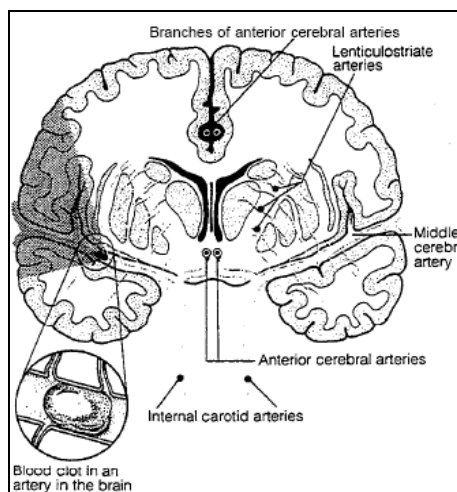
αποτέλεσμα τον θάνατο του εγκεφαλικού ιστού και μόνιμη βλάβη, χρησιμοποιείται ο όρος **εγκεφαλικό έμφρακτο**.



**Εικόνα 1.5.** Ταξινόμηση προσέγγιση των διαφόρων τύπων εγκεφαλικών επεισοδίων (Brass LM).



**Εικόνα 1.6.α.** Το watershed stroke (ακραιοπέδιου) είναι αποτέλεσμα στένωσης μεγάλων αρτηριών που αιματώνουν τον εγκέφαλο (Brass LM).

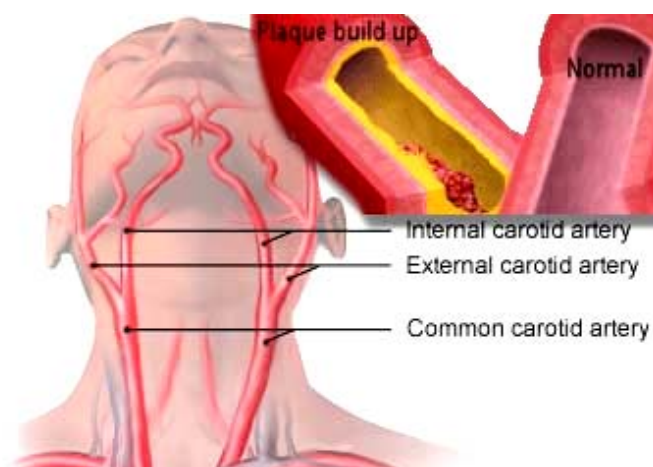


**Εικόνα 1.6.β.** Το εμβολικό εγκεφαλικό επεισόδιο είναι αποτέλεσμα ενός θρόμβου αίματος που σχηματίζεται σ' ένα άλλο σημείο του σώματος και μετακινείται μέσω της κυκλοφοριακής ροής μέχρι που συναθροίζεται σε μια αρτηρία στον εγκέφαλο (Brass LM).

Οι θρόμβοι σχηματίζονται στην περιοχή μιας αρτηρίας προσβεβλημένης από αρτηριοσκλήρυνση (εικόνα 1.7.). Το παθολογοανατομικό υπόστρωμα της αθηρωματικής νόσου είναι οι αθηρωματικές πλάκες οι οποίες αποτελούν σημεία σχηματισμού θρόμβων, με

αποτέλεσμα τη σταδιακή στένωση του αυλού του αγγείου και εν τέλει την πλήρη απόφραξη του. Στην αρτηριοσκληρυντική διαδικασία, η πλάκα -ένα αμάγαλμα λιπαρών ουσιών, χοληστερόλης, άχρηστων παραγώγων των κυττάρων, ασβεστίου και ενός υλικού πήξης του αίματος την ινική - δημιουργεί ανώμαλη επιφάνεια στο ενδοθήλιο των αρτηριών. Οι ανώμαλες επιφάνειες που δημιουργούν τα αποθέματα της πλάκας παρέχουν ιδανικούς υποδοχείς για τον σχηματισμό και την ανάπτυξη των θρόμβων. Όταν οι θρομβωμένες αθηρωματικές πλάκες έχουν τέτοιο μέγεθος ώστε να αποφράσουν σε μεγάλο βαθμό τη ροή του αίματος στο αγγείο, ενδείκνυται επέμβαση (Kistler JP et al, 1996).

Στα αρτηριοθρομβωτικά εγκεφαλικά επεισόδια συχνά προηγούνται TIA και ο χρόνος εμφάνισής τους συμπίπτει με χαμηλή αρτηριακή πίεση δηλαδή: την νύχτα κατά τη διάρκεια του ύπνου ή νωρίς το πρωί πριν ξεκινήσουν οι δραστηριότητες.



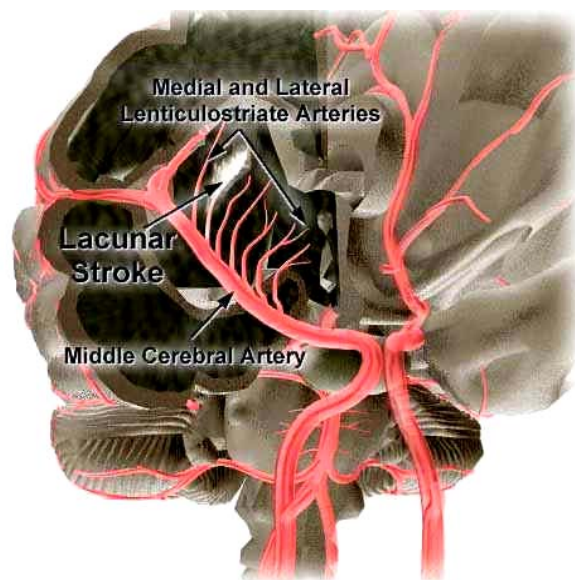
**Εικόνα 1.7.** Σχηματισμός πλάκας που προσφέρει ιδανική περιοχή σχηματισμού και ανάπτυξης των θρόμβων αίματος, που αποφράσσοντας την καρωτιδική αρτηρία προκαλούν ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο ([www.cnn.com](http://www.cnn.com))

Ένα άλλο είδος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου που περιλαμβάνει θρόμβο είναι η **εγκεφαλική εμβολή ή εμβολικό εγκεφαλικό επεισόδιο** (εικόνα 1.6.β). Αυτός ο τύπος προκαλείται από ελεύθερο θρόμβο που σχηματίζεται σε ένα μέρος του σώματος και ταξιδεύει με την ροή του αίματος μέχρι να ενσφηνωθεί σε μια αρτηρία στον εγκέφαλο ή σε ένα αγγείο που οδηγεί σε αυτόν. Υπάρχει η άποψη, ότι τα εμβολικά εγκεφαλικά επεισόδια, εμπεριέχουν θρόμβους από την καρδιά ή τις καρωτιδικές αρτηρίες.

Οι πιο κοινές καρδιακές καταστάσεις που σχετίζονται με την εμβολή είναι η κολπική μαρμαρυγή, η βαλβιδοπάθεια, η παρουσία προσθετικής καρδιακής βαλβίδας, η ενδοκαρδίτιδα, η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στην κολπική μαρμαρυγή οι κόλποι της καρδιάς δεν συστέλονται φυσιολογικά (Bungard TJ et al, 2001) και επειδή το αίμα δεν αντλείται έξω από τους κόλπους εντελώς, τείνει να πήζει και να σχηματίζει θρόμβους. Το ένα τρίτο των ατόμων που πάσχουν από κολπική μαρμαρυγή, θα εμφανίσουν εγκεφαλικό επεισόδιο και οι πλειονότητα αυτών των εγκεφαλικών επεισοδίων θα είναι εμβολικό. Το εμβολικό εγκεφαλικό επεισόδιο, είναι πιθανόν το πιο κοινό από τα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια. (Brass LM).

Το τρίτο είδος εγκεφαλικών επεισοδίων προκαλείται και αυτό από θρόμβωση του αίματος και ονομάζεται **lacunar infarction ή lacunar stroke (κενοτοπιώδες έμφρακτο ή**

**βοθηικό** (εικόνα 1.8.). Αυτά τα εγκεφαλικά επεισόδια είναι το αποτέλεσμα της απόφραξης (πλήρης φραγμός) των αρτηριδίων του εγκεφάλου. Το μικρό μέγεθος των αγγείων δυσκολεύει πολλές φορές την διάγνωση των lacunar strokes, ενώ μερικά απ' αυτά δεν έχουν αισθητά συμπτώματα. Εντούτοις, υπάρχουν κάποια κλασικά συμπτώματα που δηλώνουν την ύπαρξη ενός lacunar infarction. Το πιο κοινό είναι ένα αμιγές κινητικό έλλειμα, στο οποίο η ζημιά γίνεται στη πυραμιδική οδό για τα σήματα κίνησης από τον εγκέφαλο στον νωτιαίο μυελό. Ως αποτέλεσμα, ο ασθενής αναπτύσσει αδυναμία της μίας πλευράς χωρίς άλλα συμπτώματα. Παρόμοια, ένα lacunar stroke στον θάλαμο - το κύριο κέντρο μετάδοσης αισθήσεων - μπορεί να προκαλέσει αμιγές αισθητικό έλλειμα. Σε αυτές τις περιπτώσεις η χειρουργική επέμβαση και τα αντιθρομβωτικά φάρμακα δεν φαίνεται να βοηθούν. Η θεραπεία επικεντρώνεται στην τροποποίηση του μακροπρόθεσμου κινδύνου.



**Εικόνα 1.8.** Το lacunar stroke είναι αποτέλεσμα της πλήρους απόφραξης μιας μικρής αρτηρίας, που διεισδύει βαθιά στον εγκέφαλο (Brass LM).

Ο μηχανισμός του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου παραμένει άγνωστος σε περισσότερες από το ένα τρίτο των περιπτώσεων. Πολλές από αυτές τις περιπτώσεις εμφράγματος αγνώστου αιτίας φαίνεται να οφείλονται σε εμβολή. Η εξέλιξη της τεχνολογίας απεικόνισης μπορεί να βοηθήσουν στην κατηγοριοποίηση αυτών των εγκεφαλικών επεισοδίων καλύτερα στο μέλλον (Brass LM).

Τα **αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια**, που είναι πολύ πιο σπάνια, οφείλονται σε ρήξη του τοιχώματος αγγείου με αποτέλεσμα την εξαγγείωση αίματος. Συνηθισμένα αίτια αιμορραγικών επεισοδίων είναι η αρτηριακή υπέρταση και οι αγγειακές δυσπλασίες (ανευρύσματα, αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες). Αν η αιμορραγία συμβεί μέσα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα προκαλεί άμεση καταστροφή εγκεφαλικού ιστού (ενδοεγκεφαλική αιμορραγία), ενώ αν συμβεί στις μήνιγγες το αίμα διαχέεται στον υπαραχνοειδή χώρο (υπαραχνοειδής αιμορραγία) (Iadecola C et al, 2001).

Συνοπτικά τα παραπάνω έχουν ως εξής:

- **Ισχαιμικό επεισόδιο:** κλινικές εκδηλώσεις που αντανακλούν δυσλειτουργία συγκεκριμένης ανατομικής περιοχής. Τάση για σταθεροποίηση ή βελτίωση της κλινικής εικόνας.
- **Αιμορραγικό επεισόδιο:** αιφνίδια εγκατάσταση, κλινικές εκδηλώσεις που δεν αντιστοιχούν σε περιοχή άρδευσης συγκεκριμένης αρτηρίας, συμπεριφορά χωροκατακτητικής εξεργασίας (Gijn van J et al, 2001).

#### **1.1.4. Η ισχαιμία αφορά το καρωτιδικό ή το σπονδυλοβασικό σύστημα;**

Στη διάκριση μεταξύ ισχαιμικού και αιμορραγικού εγκεφαλικού επεισοδίου, βασική σημασία έχει να διαπιστωθεί αν η εγκεφαλική βλάβη έχει σημειολογία που αντιστοιχεί σε περιοχή άρδευσης συγκεκριμένου αγγείου. Οι κλινικές εκδηλώσεις των ΑΕΕ είναι συνάρτηση, κατά κύριο λόγο, της ανατομικής θέσης της βλάβης και κατ' επέκταση, του συγκεκριμένου αγγείου που αρδεύει την προσβληθείσα περιοχή. Ο εγκέφαλος αρδεύεται από δύο αρτηριακά

συστήματα, το καρωτιδικό και το σπονδυλοβασικό που εκφύονται από το αορτικό τόξο. Πρώτη αδρή προσέγγιση του προβλήματος αυτού αποτελεί η διάκριση μεταξύ των δύο συστημάτων που αρδεύουν τον εγκέφαλο, δηλαδή του καρωτιδικού και του σπονδυλοβασικού (Rudd A et al, 2002).

Το καρωτιδικό σύστημα αποτελείται από τις δύο κοινές καρωτίδες αρτηρίες, που στο ύψος της γωνίας της κάτω γνάθου, διχάζονται σε έξω και έσω καρωτίδα. Η έσω καρωτίδα αρδεύει τον οφθαλμό με την οφθαλμική αρτηρία, το μετωπιαίο λοβό με την πρόσθια εγκεφαλική αρτηρία, το βρεγματικό λοβό και μέρος του κροταφικού λοβού με τη μέση εγκεφαλική αρτηρία. Το σπονδυλοβασικό σύστημα αποτελείται από τις δύο σπονδυλικές αρτηρίες, οι οποίες με τη συνένωσή τους σχηματίζουν τη βασική αρτηρία που διχάζεται στις δύο οπίσθιες εγκεφαλικές αρτηρίες. Τα αγγεία αυτά αιματώνουν την παρεγκεφαλίδα, το εγκεφαλικό στέλεχος, τους ινιακούς λοβούς και μέρος των κροταφικών λοβών. Τα δύο καρωτιδικά συστήματα συνδέονται μεταξύ τους μέσω της πρόσθιας αναστομωτικής αρτηρίας και με το σπονδυλοβασικό σύστημα μέσω των δύο οπίσθιων αναστομωτικών αρτηριών. Το σύστημα αυτό των αναστομώσεων είναι γνωστό ως εξάγωνο ή κύκλος του Willis (Rudd A et al, 2002).

**Πίνακας 1.3**

<b>Οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις επί ισχαιμίας του καρωτιδικού και του σπονδυλοβασικού συστήματος</b>	
<b>Καρωτιδικό σύστημα</b>	<b>Σπονδυλοβασικό σύστημα</b>
Θάμβος ή αμαύρωση ενός οφθαλμού	Διπλωπία
Αδυναμία – υπαισθησία ενός κάτω άκρου	Δυσκαταποσία
Αφασία	Ίλιγγος
Αδυναμία – υπαισθησία ημιπροσώπου και ομόπλευρου άνω άκρου (ενδεχομένως και κάτω άκρου σε ήτλιο βαθμό)	Διαταραχή Ισορροπίας
	Διαταραχή επιπέδου συνειδήσεως
	Συνδυασμός ενός ή περισσότερων από τα πα ημιπάρεση - ημιυπαισθησία

Στον πίνακα 1.3. συνοψίζονται οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις που συνοδεύουν τις διαταραχές αιμάτωσης κάθε ενός από τα δύο συστήματα. Συνοψίζοντας παρατηρούμε ότι σε

περίπτωση ισχαιμίας του καρωπιδικού συστήματος οι κλινικές εκδηλώσεις είναι συνήθως ετερόπλευρες.

#### **1.1.4. Πρόληψη αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου**

Υπολογίζεται ότι σημαντικό ποσοστό (περίπου 60%) των ασθενών που επιζούν μετά από οξύ αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο εμφανίζουν σημαντικό βαθμό αναπηρία. Τα προληπτικά μέτρα είναι δυνατόν να αφορούν σε άτομα χωρίς ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (πρωτογενής πρόληψη) ή να αποσκοπούν στην αποτροπή της εμφάνισης νέου αγγειακού επεισοδίου σε άτομα που έχουν ήδη προσβληθεί (δευτερογενής πρόληψη) (Brass LM).

##### **1.1.5.1. Πρωτογενής πρόληψη**

Η πρωτογενής πρόληψη εκτός από την τήρηση γενικών μέτρων, όπως σωστή διατροφή, έλεγχος σωματικού βάρους και σωματική άσκηση, κύριος στόχος της είναι η αντιμετώπιση παραγόντων κινδύνου που προδιαθέτουν στην εμφάνιση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (Freitas GR et al, 2001).

Οι παράγοντες κινδύνου διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: **μη τροποποιήσιμοι και τροποποιήσιμοι**. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι παράγοντες που η δράση τους δεν είναι δυνατόν να τροποποιηθεί με οποιαδήποτε παρέμβαση. **Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου** είναι η ηλικία, το φύλο, η φυλή και η κληρονομικότητα (Brass LM).

- **Ηλικία.** Η πιθανότητα εμφάνισης αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου είναι μεγαλύτερη σε άτομα μεγάλης ηλικίας και αυξάνει προοδευτικά ανά πενταετία.
- **Φύλο.** Τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια είναι στο σύνολό τους συχνότερα στους άντρες. Αυτό ισχύει κυρίως για τα επεισόδια ισχαιμικού τύπου, που είναι συχνότερα στους άντρες σε ποσοστό 45% σε σύγκριση με τις γυναίκες.
- **Φυλή.** Από μελέτες που έχουν διεξαχθεί στις ΗΠΑ προκύπτει ότι τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια είναι συχνότερα στα άτομα μαύρης φυλής, ενώ αυξημένη



συχνότητα παρατηρείται και σε χώρες της Ασίας (Ιαπωνία, Κίνα). Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι σύμφωνα με αποτελέσματα συγκριτικών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί στην Ιαπωνία και σε άτομα Ιαπωνικής καταγωγής που έχουν μεταναστεύσει στις ΗΠΑ, η συχνότητα αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων είναι περίπου τριπλάσια στους αυτόχθονες Ιάπωνες, παρά το γεγονός ότι το διαιτολόγιό τους περιλαμβάνει μικρότερη αναλογία κεκορεσμένων λιπών και πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης.

- **Κληρονομικότητα.** Σύμφωνα με τα δεδομένα που έχουν προκύψει από πολλές επιδημιολογικές μελέτες, το ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου σε συγγενείς πρώτου βαθμού αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου.

Καθώς η δράση των μη τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου δεν μπορεί όπως είναι ευνοητό να επηρεασθεί από οποιαδήποτε παρέμβαση, το κύριο ενδιαφέρον είναι φυσικό να στρέφεται προς τους **τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου**, εκείνους δηλαδή που είναι δυνατόν να επηρεασθούν από θεραπευτικές ή άλλες παρεμβάσεις. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνεται μεγάλος αριθμός παραγόντων κινδύνου που έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τη βλαπτική τους δράση στα αιμοφόρα αγγεία. Κύριο αποτέλεσμα αυτής της δράσεως είναι η αθηρωμάτωση των μεγάλων και μεσαίου εύρους αρτηριών, αλλοιώσεις που προδιαθέτουν στην εκδήλωση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Οι κυριότεροι από τους παράγοντες κινδύνου παρουσιάζονται στη συνέχεια (Brass LM).

- **Αρτηριακή υπέρταση.** Φαίνεται ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης, ακόμη και της ήπιας, και του κινδύνου αγγειακού επεισοδίου.
- **Καρδιοπάθεια.** Ο κίνδυνος αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου αυξάνει επί παρουσίας ποικίλων καρδιακών νόσων που προαναφέρθησαν (κολπική μαρμαρυγή, στένωση της μιτροειδούς βαλβίδας, η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και το πρόσφατο έμφραγμα του μυοκαρδίου).

- **Σακχαρώδης διαβήτης.** Η πιθανότητα εμφάνισης ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου σε άτομο που πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου διπλάσια από την αντίστοιχη του γενικού πληθυσμού.
- **Υπερλιπιδαιμία.** Τα αυξημένα επίπεδα χοληστερίνης στο αίμα αποτελούν παράγοντα κινδύνου για ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, λόγω της σχέσεως τους με την αρτηριοσκλήρυνση των αγγείων μεγάλης διαμέτρου.
- **Νόσοι των αγγείων.** Τα άτομα με ασυμπτωματική στένωση της καρωτίδας διατρέχουν διπλάσιο κίνδυνο αγγειακού επεισοδίου από τον αντίστοιχο του γενικού πληθυσμού.
- **Παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο.** Έχει διαπιστωθεί ότι ποσοστό άνω του 10% των ασθενών με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ισχαιμικού τύπου έχουν ιστορικό παροδικού ισχαιμικού επεισοδίου, που αποτελεί συνεπώς σημαντικό παράγοντα κινδύνου. Ο κίνδυνος αυτός είναι μεγαλύτερος κατά τους πρώτους μήνες μετά το παροδικό επεισόδιο καθώς έχει υπολογιστεί ότι τουλάχιστον 50% των αγγειακών επεισοδίων σε ασθενείς με ιστορικό παροδικού επεισοδίου εκδηλώνονται στη διάρκεια του πρώτου έτους μετά το παροδικό επεισόδιο. Το παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο αποτελεί απόλυτη ένδειξη χορήγησης αντιαιμοπεταλιακής αγωγής. Η αντιμετώπιση αυτή αποτελεί στην ουσία δευτερογενή πρόληψη.
- **Νόσοι του αίματος.** Στην κατηγορία αυτή υπάγονται η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η πολυκυτταραιμία, η λευχαιμία και η θρομβοκυτταραιμία.
- **Διαταραχές πήκτικότητας.** Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο όπου παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων, αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου. Το ίδιο ισχύει, σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία, για την ανεπάρκεια των πρωτεϊνών C και S και της αντιθρομβίνης III, καθώς και για τη μετάλλαξη Leiden του παράγοντα πήξεως V.
- **Κάπνισμα.** Ο κίνδυνος αυτός είναι δόσοεξαρτώμενος, καθώς τα άτομα που καπνίζουν έως 10 τσιγάρα καθημερινά διατρέχουν διπλάσιο κίνδυνο από τον αντίστοιχο των μη

καπνιστών, ενώ για τα άτομα που καπνίζουν πάνω από 40 τσιγάρα καθημερινά ο κίνδυνος είναι τετραπλάσιος.

- **Ομοκυστεϊναιμία** Η ομοκυστεΐνη είναι παράγωγο του αμινοξέος μεθειονίνη και τα επίπεδα της στον ορό φαίνεται ότι καθορίζονται κυρίως από γενετικούς παράγοντες. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, υπάρχει σημαντική και μάλιστα γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων ομοκυστεΐνης του ορού και του κινδύνου αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (Hankey G et al, 2001).
- **Λήψη οιστρογόνων.** Αρχικά είχε θεωρηθεί ότι η λήψη αντισυλληπτικών από το στόμα αποτελούσε βέβαιο παράγοντα κινδύνου για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο αλλά στη συνέχεια η άποψη αυτή αποτέλεσε αντικείμενο διαφωνίας. Υποστηρίζεται ότι η λήψη αντισυλληπτικών τρίτης γενεάς δεν συνοδεύεται από ανάλογο κίνδυνο, ούτε όμως και αυτή η άποψη είναι γενικά αποδεκτή. Φαίνεται ότι αυξημένο κίνδυνο διατρέχουν γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά ενώ εμφανίζουν και άλλους παράγοντες κινδύνου όπως κάπνισμα ή αρτηριακή υπέρταση. Αντίθετα, θεραπεία αποκατάστασης μετά την εμμηνόπαυση φαίνεται ότι δρα προστατευτικά. Στους άντρες η λήψη οιστρογόνων όπως π.χ. σε ασθενείς με καρκίνωμα του προστάτη, φαίνεται ότι αυξάνει το κίνδυνο αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου.
- **Άλλοι παράγοντες κινδύνου.** Η έρευνα για την ανεύρεση και άλλων παραγόντων που ευθύνονται για την πρόκληση αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων συνεχίζεται καθώς σε σημαντικό ποσοστό (ως και 40%) των ασθενών δεν διαπιστώνεται η ύπαρξη συγκεκριμένου προδιαθεσικού παράγοντα. Πολλές νοσηρές καταστάσεις έχουν ενοχοποιηθεί όπως η παχυσαρκία, η έλλειψη σωματικής άσκησης, η ημικρανία, η χρήση τοξικών ουσιών (κυρίως κοκαΐνης), η αύξηση ινωδογόνου του ορού καθώς και η έντονη σωματική ή ψυχική καταπόνηση.

### 1.1.5.2. Δευτερογενής πρόληψη

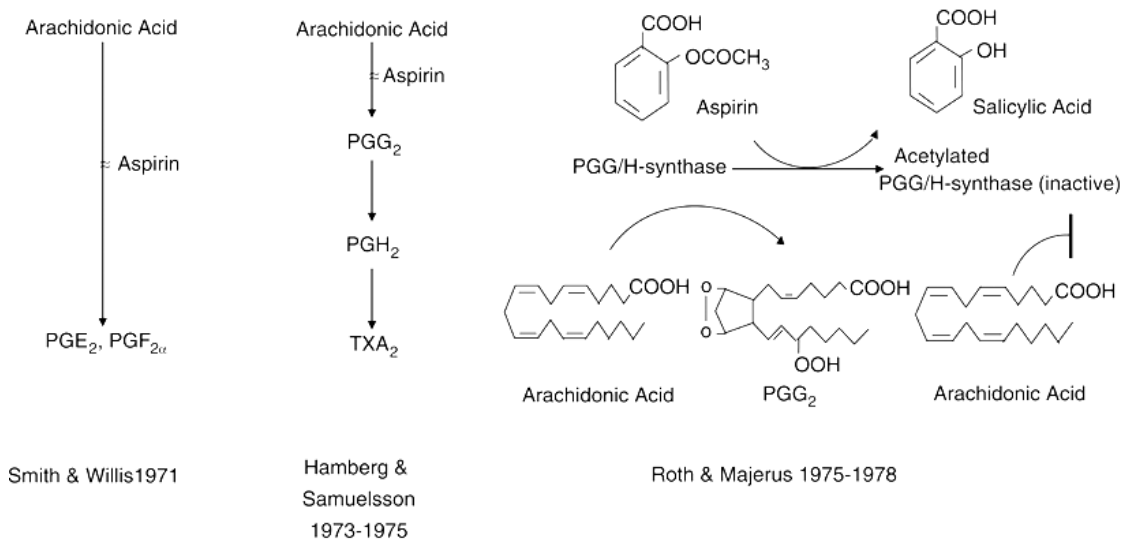
Τα φάρμακα, που συμβάλουν στη δευτερογενή πρόληψη είναι τα **αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα**. Τα αιμοπετάλια, όταν έλθουν σε επαφή με το απογυμνωμένο ενδοθήλιο των αθηρωματικών αγγείων πυροδοτούν μία αλληλουχία συγκεκριμένων γεγονότων (ενεργοποίηση, προσκόλληση, συσσώρευση) που τελικά οδηγεί στη δημιουργία θρόμβου. Ουσίες οι οποίες παρεμβαίνουν σε οποιοδήποτε σημείο αυτής της αλληλουχίας, διαθέτουν αντιαιμοπεταλιακή και δυναμικά αντιθρομβωτική δράση (Hayden M et al, 2002).

Από τις πρώτες ουσίες που μελετήθηκαν ως δυναμικοί αντιθρομβωτικοί παράγοντες και μέχρι πρότινος η μόνη χρησιμοποιούμενη, ήταν η **ασπιρίνη**. Είναι η ακετυλιωμένη μορφή του ακετυλοσαλικιλικού οξέος που περιορίζει την παραγωγή της θρομβοξάνης  $A_2$ , ισχυρού παράγοντα συσσώρευσης αιμοπεταλίων, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση και συγκόλληση τους (Hayden M et al., 2002). Η δράση της προσδιορίζεται εν μέρει στην σύνθεση των προσταγλανδινών μέσω των ενζύμων COX-1 και COX-2 (Loll PJ et al, 1995). Ανάμεσα στα ΜΣΑΦ η ασπιρίνη είναι μοναδική διότι έχει αναλγητική, αντιπυρετική, αντιφλεγμονώδη, αλλά και ευεργετική στο καρδιαγγειακό σύστημα δράση μέσω των προσταγλανδινών και της θρομβοξάνης. Σε υψηλές δόσεις μπλοκάρει την σύνθεση PG (προσταγλανδινών) και TX (θρομβοξάνης) μέσω της δράσης της COX-1. Επιπρόσθετα η ασπιρίνη είναι σημαντικός καταλύτης στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μειώνοντας την παραγωγή θρομβοξάνης  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>), όπως επίσης μειώνει και την ενδοθηλιακή παραγωγή προστακυκλίνης (PGI<sub>2</sub>), που καταλύει τη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων και την αγγειοδιαστολή. Δηλαδή στην διαδικασία της πήξης εξισορροπεί τα επίπεδα TXA<sub>2</sub> και PGI<sub>2</sub>. Αυτό επιτρέπει τον σχηματισμό θρόμβου κατά την πήξη αλλά διατηρείται η αιματική ροή στα αγγεία.

Ένα τμήμα της ευεργετικής δράσης της ασπιρίνης στο καρδιαγγειακό σχετίζεται με την δόσοεξαρτώμενη διαφορετική της επίδραση στην διαδικασία της φλεγμονής. Μόνο σε μικρές δόσεις η ασπιρίνη θα αποδώσει την πιο σημαντική της αντιφλεγμονώδη δράση. Η μέσω της

χαμηλής δόσης αντιφλεγμονώδη δράση αποδίδεται στην ικανότητά της να πυροδοτεί τη σύνθεση των λιποξινών (LXs). Οι υψηλότερες δόσεις δεν έχουν σημαντική επίδραση στην σύνθεση τους. Οι λιποξίνες είναι αντιφλεγμονώδη εικοσανοειδή που συνθέτονται μέσω της λιποξυγενάσης. Στα εικοσανοειδή αυτά περιλαμβάνονται οι προσταγλανδίνες (PGs), οι θρομβοξάνες (TXs), οι λευκοτριένες (LTs), και οι λιποξίνες (LXs). Η αντιφλεγμονώδης δράση των λιποξινών, οφείλεται εν μέρει με το να ενισχύουν τη δράση των λευκοτριενών. Έτσι εξηγείται η χρήση της ασπιρίνης στη δευτερογενή πρόληψη των ασθενών με ΑΕΕ (εικόνα 1.9.).

Οι ασθενείς που λαμβάνουν προληπτική θεραπεία με ασπιρίνη, προστατεύονται σε ικανοποιητικό βαθμό από την αρτηριακή θρόμβωση. Φαίνεται λοιπόν ότι το φάρμακο ασκεί τις αντιθρομβωτικές του επιδράσεις μέσω και άλλων μηχανισμών εκτός από τη γνωστή αναστολή της συνάθροισης των δραστικοποιημένων αιμοπεταλίων (Altman R et al, 2004). Δηλαδή, εκτός της αναστολής της COX-1, η ασπιρίνη μπορεί επίσης να αναστέλλει τις οδούς της προφλεγμονώδους σηματοδότησης, τη γονιδιακή έκφραση, καθώς και άλλους παράγοντες εξίσου σημαντικούς της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της, όπως μηχανισμούς που ελέγχουν και ρυθμίζουν την παθογένεση της φλεμονής ενώ ταυτόχρονα αυξάνει το ρυθμό σύνθεσης ενδογενών προστατευτικών αντιφλεγμονοδών παραγόντων (Altman R, 2003).



**Εικόνα 1.9.** Η επίδραση της ασπιρίνης σε διάφορα βασικά μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού

Άλλα αντιαιμοπεταλικά φάρμακα είναι τα εξής:

Η **διπυριδαμόλη**, παρεμβαίνει στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων ενισχύοντας τη δράση της προστακυκλίνης (PGI<sub>2</sub>) ή αναστέλλοντας τη δράση της πυρηνικής φωσφοδιεστεράσης και κατά συνέπεια αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (κυκλικό AMP). Μελετήθηκε τόσο ως μονοθεραπεία όσο και ως ενισχυτική της δράσης της ασπιρίνης, στα πλαίσια της δευτερογενούς πρόληψης του ισχαιμικού αγγειακού επεισοδίου.

Η **τικλοπιδίνη** και η **κλοπιδογρέλη**, αναστέλλουν την πυροδοτούμενη από τη διφωσφορική αδενοσίνη, δημιουργία γεφυρών ινωδογόνου, στάδιο βασικό για τη δευτερογενή πρόληψη όχι μόνο του ισχαιμικού ΑΕΕ αλλά και άλλων ισχαιμικών αγγειοπαθειών (Bhatt DL et al, 2002).

Περισσότερες από 50 κλινικές μελέτες έχουν διενεργηθεί προκειμένου να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων στην πρόληψη του ΑΕΕ. Μία από τις πιο αξιόπιστες κλινικές μελέτες, είναι η μετα-ανάλυση της **Antiplatelet Trialists Collaboration** που διενεργήθηκε το 1994 και επεξεργάστηκε τα αποτελέσματα 145 προηγούμενων μελετών με συνολικό αριθμό 73.249 ασθενών με υψηλό κίνδυνο να εμφανίσουν αγγειακό επεισόδιο (ασθενείς με ασταθή στηθάγχη, έμφραγμα μυοκαρδίου, ΑΕΕ ή παροδικό ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και άλλα αίτια που αυξάνουν τον κίνδυνο αθηροθρομβωτικών συμβαμάτων). Η μελέτη αυτή βεβαιώνει ότι η αντιαιμοπεταλική αγωγή μειώνει την πιθανότητα επέλευσης αγγειακού γενικά επεισοδίου (ΑΕΕ, εμφράγματος μυοκαρδίου η θανάτου από αγγειακά αίτια) κατά 27%. Επίσης, μειώνεται η πιθανότητα μη θανατηφόρου ΑΕΕ στους ίδιους ασθενείς κατά 31%, ενώ ειδικά στην περίπτωση ασθενών με προηγούμενο ΑΕΕ ή παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο μειώνονται οι πιθανότητες επέλευσης νέου ΑΕΕ κατά 22%.

Πιο πρόσφατη **μετα-ανάλυση που διενέργησε η Antiplatelet Trialists Collaboration** και ολοκληρώθηκε τον Ιανουάριο του 2002, αναλύει τα αποτελέσματα

από 287 προηγούμενες μελέτες με συνολικό αριθμό συμμετεχόντων 212.000 (135.000 ασθενών και 77.000 μαρτύρων). Κριτήριο της μετα-ανάλυσης ήταν η επέλευση «σοβαρού αγγειακού επεισοδίου», δηλαδή μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου, μη θανατηφόρο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ή θάνατος από αγγειακά αίτια. Και στη μελέτη αυτή, διαπιστώθηκε ότι η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία μειώνει τον συνολικό κίνδυνο σοβαρού αγγειακού επεισοδίου κατά ένα τέταρτο περίπου. Σε τιμές απόλυτης μείωσης του κινδύνου επέλευσης σοβαρού αγγειακού επεισοδίου, υπολογίστηκε ότι, για κάθε 1000 ασθενείς με προηγούμενο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (εγκατεστημένο ή παροδικό) που λαμβάνουν αντιαιμοπεταλικό φάρμακο επί 2 χρόνια, προλαμβάνονται 36 σοβαρά αγγειακά συμβάματα. Θα ήταν ίσως, χρήσιμη η υπενθύμιση ότι η αθηρωματική νόσος προσβάλλει το σύνολο των αγγείων του οργανισμού και όχι επιλεκτικά τα αγγεία κάποιου οργάνου. Έτσι, παρά τις ιδιαιτερότητες που ενδεχομένως να υφίστανται στη δομή και φυσιολογία των αγγείων κάποιου οργάνου, θα ήταν επιθυμητό, η προληπτική αντιθρομβωτική δράση των φαρμάκων να επεκτείνεται σε όλα τα αγγεία του σώματος (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 2002).

Συχνά παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ασθενών στην αποτελεσματικότητα της πρόληψης με τη χρήση αντιαιμοπεταλικών φαρμάκων. Αυτό οφείλεται τόσο σε διαφορές ως προς την αιτιοπαθογένεια των ΑΕΕ όσο και στον αριθμό των προηγηθέντων ΑΕΕ, καθώς θεωρείται ότι επαναλαμβανόμενα ΑΕΕ προλαμβάνονται δυσκολότερα. Η επιλογή των ουσιών στις οποίες θα ανατεθεί το βαρύ φορτίο της δευτερογενούς πρόληψης στηρίζεται κυρίως στην ερμηνεία της σχετικής αποτελεσματικότητας, ασφάλειας και κόστους που χαρακτηρίζει καθένα από αυτά. Τα τελευταία χρόνια γίνονται εκτεταμένες προσπάθειες για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των διαφόρων ουσιών.

## **1.2. Εισαγωγή στο κυτόχρωμα P450**

Η βιοχημεία του κυτταρικού μεταβολισμού των θηλαστικών είναι μία περίπλοκη σειρά ενζύμων και μεταβολικών προϊόντων των οποίων σκοπός είναι να παράγουν ενέργεια για τη ζωή, όπως και για την προστασία της ακρίβειας στον αναδιπλασιασμό του DNA. Για τους ανθρώπους αυτές οι δραστηριότητες εμφανίζονται σ' ένα εχθρικό περιβάλλον, όπου συνεχής έκθεση σε μία ευρεία ποικιλία ξένων χημικών (xenobiotics) είναι κοινότοπη. Τα φυτά και τα ζώα ως πηγές τροφής που καταναλώνει ο άνθρωπος είναι πλούσια στην ποικιλία των χημικών συστατικών τους. Ο τρέχων τρόπος ζωής του ανθρώπου ενθαρρύνει την χρήση απορριπτέων υλικών που οδηγούν στην ρύπανση. Η βιομηχανική πρόοδος συχνά σχετίζεται με την εξάπλωση νέων συνθετικών χημικών. Η ανάπτυξη και αποδοχή της φαρμακευτικής βιομηχανίας έχει εισάγει την γενική χρήση των θεραπευτικών φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών (Ingelman-Sundberg M, 2002).

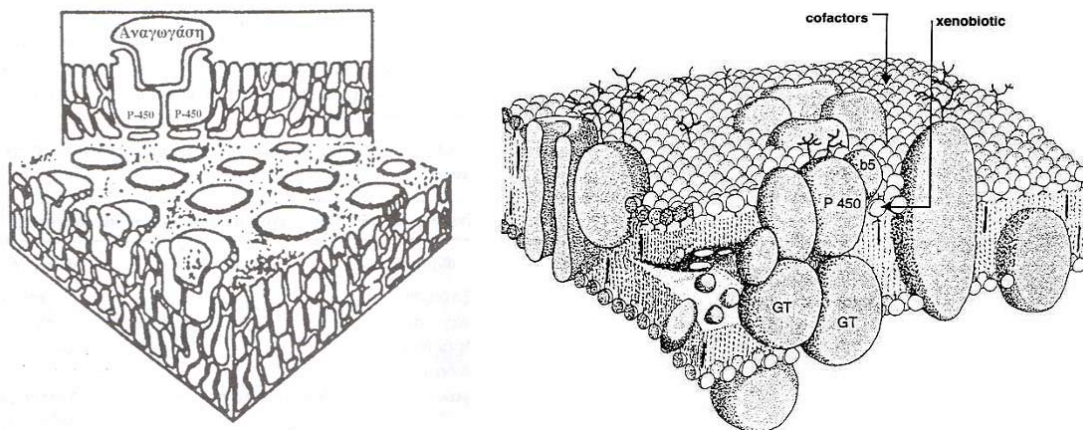
Κατά την εξέλιξη των ευκαρυωτικών κυττάρων και τη φυλογενετική ποικιλία των οργανισμών, προέκυψαν μηχανισμοί με σκοπό την προστασία του ανθρώπου από τις χημικές προσβολές. Ένα από αυτά τα προστατευτικά συστήματα που αναγνωρίζεται σήμερα και περιέχει ως κεντρικό μέρος μια μοναδική πρωτεΐνη αίμης, ονομάζεται P450. Τα μέλη αυτής της υπεροικογένειας των αιμοπρωτεϊνών είναι αξιοσημείωτα για τη μεγάλη ετερογενή δράση τους και την ευρεία κατανομή τους στην βιολογία. Οι πρωτεΐνες P450 είναι η έκφραση μιας υπεροικογένειας γονιδίων (CYP) που περιέχει πάνω από 40 διαφορετικά μέλη στον άνθρωπο (και 1000 στη βιολογία). Στους ανθρώπους (και στα περισσότερα άλλα θηλαστικά) τα P450 παίζουν κρίσιμο ρόλο, καταλύοντας αντιδράσεις λειτουργικές ως προς:

- 1) τη βιοσύνθεση των στεροειδικών ορμόνων (μετατροπή της χοληστερόλης σε ανδρογόνα, οιστρογόνα, γλυκο- και μέταλλο- κορτικοειδή).



- 2) το μεταβολισμό ξενοβιοτικών σε ενεργούς μεταβολίτες (ελεύθερες ρίζες), που αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά μακρομόρια (DNA, RNA, πρωτεΐνες) ή υποβάλλονται σε αποτοξίνωση αντιδρώντας με κυτταρικά στοιχεία, όπως η γλουταθειόνη.
- 3) την οξείδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων (σύνθεση και καταβολισμό προσταγλανδίνων).
- 4) το μεταβολισμό λιποδιαλυτών βιταμινών (μετατροπή στις ενεργές μορφές).

Ξεκάθαρα τα P450 παίζουν βασικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό και την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Το ενζυμικό αυτό σύστημα, που αποτελεί γενικά την πρώτη ενζυμική άμυνα του οργανισμού έναντι των ξενοβιοτικών, είναι συνδεδεμένο στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου οι οποίες είναι λιποπρωτεϊνικής σύστασης (εικόνα 1.10). Η παρουσία αυτού του συστήματος μέσα σε αυτό το λιποπρωτεϊνικό υλικό είναι καθοριστικής σημασίας, αφού τα λιπόφιλα υποστρώματα (οι ξενοβιοτικές ουσίες εν προκειμένω) εκλεκτικά κατανέμονται στις λιπιδιακής φύσης μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου και βιομετατρέπονται.



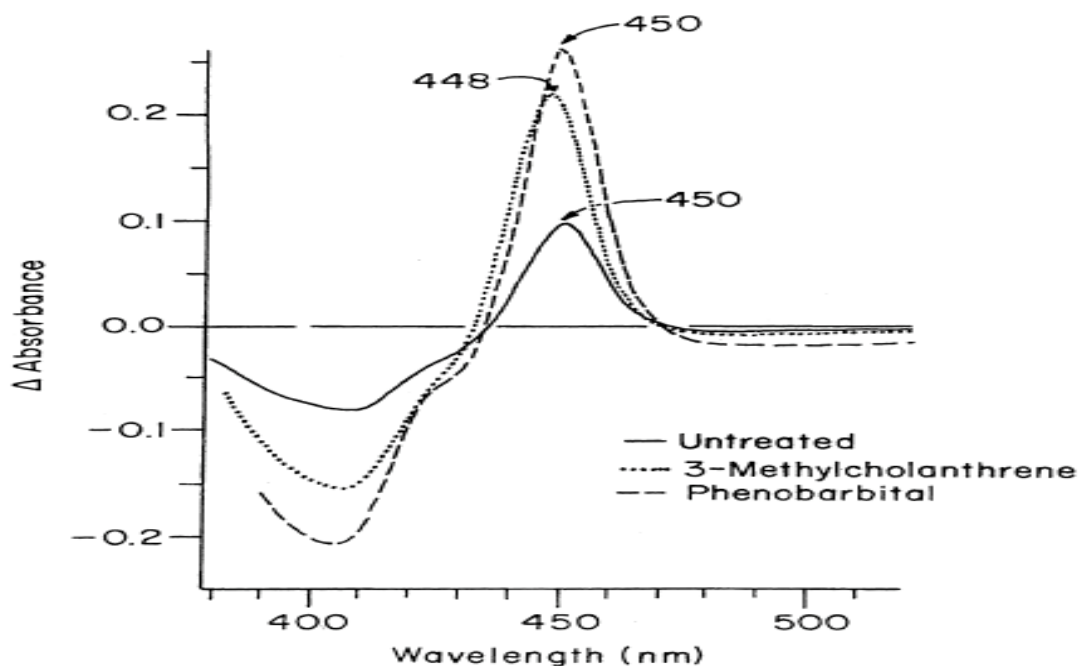
**Εικόνα 1.10** Το ενσωματωμένο στη μεμβράνη του λείου ενδοπλασματικού δικτύου, ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450. (Κουτσελίνης Α, 1997)

Η πρώτη αναφορά για την ύπαρξη CYP ενζύμου δημοσιεύτηκε το 1958 από τον Martin Klingenberg (Klingenberg M, 1958). Το ένζυμο αυτό συνδεόμενο με το CO

σχημάτιζε σύμπλοκο το οποίο και εμφάνιζε μήκος κύματος μέγιστης οπτικής απορρόφησης στα 450 nm και όταν η αιμοπρωτεϊνική φύση του αναγνωρίστηκε, του δόθηκε το όνομα «κυτόχρωμα P450» (εικόνα 1.11) (Omura T et al, 1964).

Οι πρωτεΐνες του κυτοχρώματος P450, που καλούνται σήμερα ως CYP πρωτεΐνες ή CYPs ή και P450s, έχουν βρεθεί να εκφράζονται με ευρεία διάδοση σε πολλά έμβια είδη, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των μυκήτων, των φυτών, των ψαριών και των θηλαστικών (Nelson DR, 1996). Φαίνεται ότι είναι απολύτως απαραίτητες στα ευκαρυωτικά είδη, αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο και στα προκαρυωτικά, μιας και μερικά βακτήρια δεν διαθέτουν τέτοια ένζυμα (Nelson DR, 1999). Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν ανάγκη τα ένζυμα αυτά για την βιοσύνθεση των στερολών, συστατικών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Omura T, 1999).

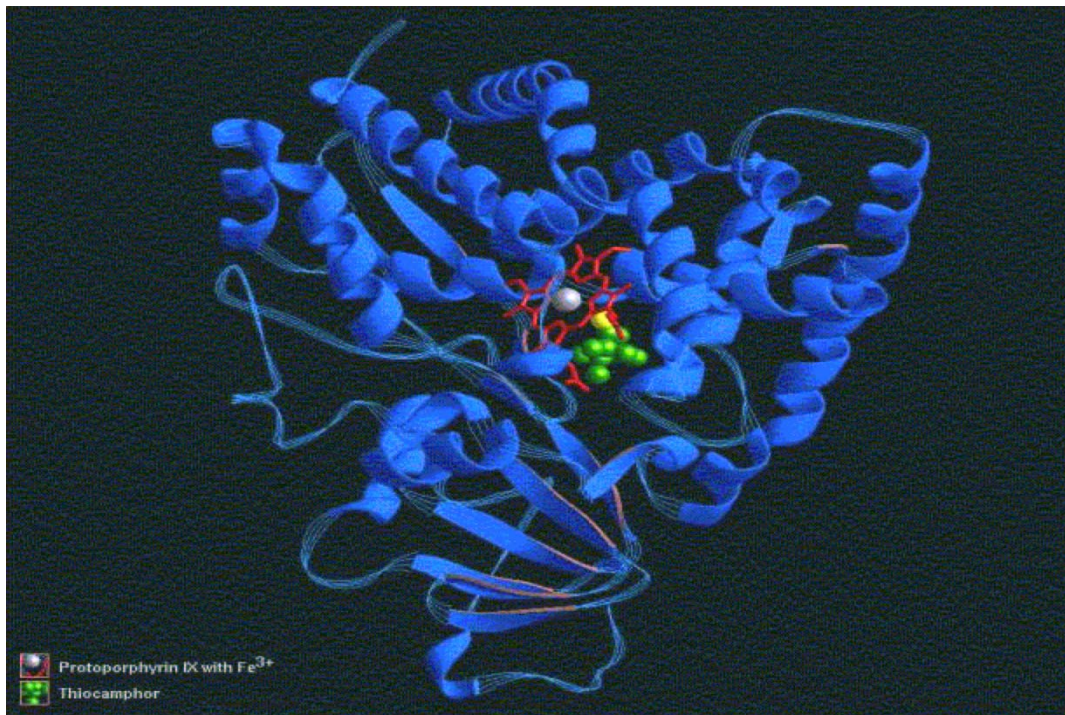
Τα ευκαρυωτικά CYP ένζυμα είναι ως επί των πλείστων δεσμευμένα στην μεμβράνη του λείου ενδοπλασματικού δικτύου, αλλά μερικά εμφανίζονται και στις εσωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Για να λειτουργήσουν, τα ένζυμα αυτά απαιτούν μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπου στο ενδοπλασματικό δίκτυο η πηγή αυτή είναι η NADPH-κυτόχρωμα P450 αναγωγάση, που προηγουμένως καλούνταν NADPH-κυτόχρωμα C αναγωγάση (Omura T, 1999). Στα μιτοχόνδρια, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADPH στην ρεδοξίνη μέσω της ρεδοξινικής αναγωγάσης και έπειτα στο CYP (Gonzalez FJ, 1990). Παρά την περιστασιακή μικρή ομοιότητα στην αλληλουχία, όλα τα CYPs έχουν μία παρόμοια αναδίπλωση με ένα υψηλά συντηρημένο πυρήνα (Reichhart D et al, 2000).



**Εικόνα 1.11.** Η οπτική απορρόφηση των ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Το ένζυμο αυτό συνδεδεμένο με το CO σχημάτιζε σύμπλοκο το οποίο και εμφάνιζε μήκος κύματος μέγιστης οπτικής απορρόφησης στα 450 nm (Hasler JA et al, 1999)

### 1.2.1 Τι είναι τα P450s;

Τα P450s είναι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες αίμης που ενεργοποιούν το μοριακό οξυγόνο για τον οξειδωτικό μεταβολισμό μιας μεγάλης ποικιλίας λιποφιλικών οργανικών χημικών. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα τα P450s υπάρχουν ως αιμοπρωτεΐνες δεσμευμένες στη μεμβράνη και κάθε μια από τις οποίες περιέχει περίπου 500 αμινοξέα με σίδηρο-πρωτοπορφυρίνη IX ως προσθετική ομάδα. Αυτό που διαφοροποιεί τα P450s από τις άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες αίμης είναι ο ρόλος μιας ομάδας θειόλης από μια κυστεΐνη της πρωτεΐνης, η οποία λειτουργεί ως υποκαταστάτης στο σίδηρο της αίμης. Οι περισσότερες αιμοπρωτεΐνες στα θηλαστικά (π.χ. αιμοσφαιρίνη, κυτόχρωμα b, υπεροξειδάσες) έχουν ένα άζωτο από την ομάδα της ημιδαζόλης της ιστιδίνης που λειτουργεί ως αντίστοιχος σύνδεσμος. Ο ρόλος της ομάδας θειόλης ως υποκαταστάτης διαφοροποιεί την πυκνότητα ηλεκτρονίων του δακτυλίου της πορφυρίνης στο μόριο της αίμης παρέχοντας έτσι ένα κέντρο ηλεκτρονίων για την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου (εικόνα 1.12.).



**Εικόνα 1.12.** Κρυσταλλογραφική δομή ενζύμου του κυτόχρωματος P450 ([www.astrazeneca.no](http://www.astrazeneca.no))

### **1.2.2. Βιοχημικές ιδιότητες**

Σήμερα έχουμε ευρεία γνώση για το κυτόχρωμα P450. Περίπου 1000 γονίδια για διαφορετικές P450s έχουν κλωνοποιηθεί, αναγνωριστεί οι αλληλουχίες τους και εκφραστεί σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης (Nelson, Koymans et al, 1996). Πολλές από τις αντιδράσεις που καταλύονται από το P450 έχουν χαρακτηριστεί, δείχνοντας τη μεγάλη ποικιλία δράσης αυτών των αξιοσημείωτων καταλυτών. Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 40 διαφορετικοί τύποι αντιδράσεων που καταλύονται από τα P450. Ο αριθμός των χημικών ουσιών που μπορούν να λειτουργήσουν ως υποστρώματα που μεταβολίζονται από τα P450 είναι τεράστιος και σίγουρα είναι μεγαλύτερος από 1000. Γνωστές ιδιότητες των P450s είναι:

α) Οι πρωτεΐνες P450 περιέχουν περίπου 500 αμινοξέα. Ένα μόριο κυστεΐνης βρίσκεται κοντά στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης παρέχοντας τον απαραίτητο υποκαταστάτη θειόλης για τον σίδηρο της αίμης. Η ενδεικτική αλληλουχία για τα περισσότερα CYPs που περιέχουν αυτό το κατάλοιπο κυστεΐνης είναι η «FxxGxxxCxG».

Το άμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης είναι πλούσιο σε υδρόφοβα αμινοξέα και πιστεύεται ότι δρα ως βασικό μέρος για τη δέσμευση της πρωτεΐνης στις μεμβράνες.

β) Τα P450s καταλύουν το NADPH και τον εξαρτώμενο από το οξυγόνο οξειδωτικό μετασχηματισμό ενός μεγάλου αριθμού χημικών ενώσεων. Γενικά ένα συγκεκριμένο P450 καταλύει το μεταβολισμό ενός περιορισμένου αριθμού χημικών δομών (όπως τα στεροειδή και τα λιπαρά οξέα), ενώ άλλα P450s έχουν μια ευρεία εξειδίκευση υποστρωμάτων, υποδηλώνοντας ένα ρόλο για μια μοναδική «ενεργή γεωμετρική θέση» για ένα P450.

γ) Σε ιστούς όπως το ήπαρ, το έντερο και ο φλοιός του επινεφριδιακού αδένου, η συγκέντρωση των P450s υπερέρχει κατά πολύ της συγκέντρωσης άλλων αιμοπρωτεϊνών (όπως τα κυτοχρώματα του μιτοχονδρίου).

δ) Τα P450s διανέμονται σε όλα σχεδόν τα όργανα του ανθρώπινου σώματος, αν και ο τύπος του P450 σε ένα όργανο μοιάζει να είναι συγκεκριμένος.

ε) Η κυτταρική έκφραση πολλών P450s ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται κατά την έκθεση σε διάφορα χημικά. Η ικανότητα ενός χημικού να λειτουργήσει ως «υποκινητής» γενικά συνδέεται με μια οικογένεια P450s, π.χ. οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες θα υποκινήσουν ένα τύπο P450s, ενώ τα βαρβιτουρικά θα υποκινήσουν ένα διαφορετικό τύπο P450s.

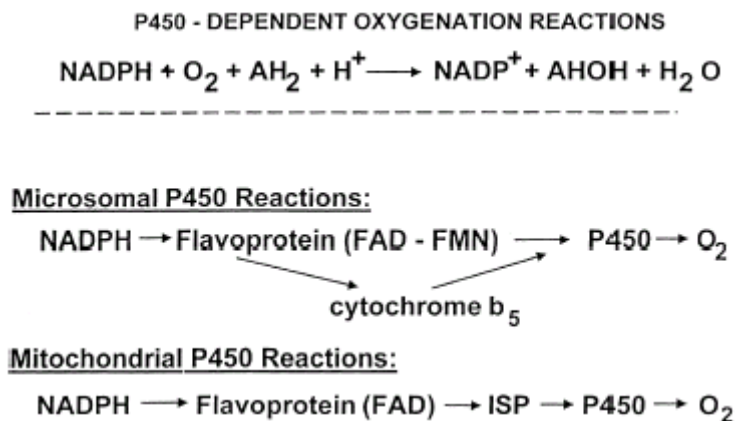
### **1.2.3 Τι κάνουν τα P450;**

Η οξειδωση είναι ο πλέον κοινός τρόπος βιομετατροπής των χημικών ουσιών. Οι διάφορες οξειδώσεις λαμβάνουν χώρα κυρίως στο ηπατικό μικροσωματικό σύστημα με τη βοήθεια ενός ενζυμικού συστήματος, του κυτοχρώματος P450.

Τα P450s είναι μέλη της τάξης των ενζύμων που ονομάζονται οξυγενάσες. Ειδικότερα, τα P450s είναι μονοοξυγενάσες ή οξειδάσες μεικτής λειτουργίας. Οι αντιδράσεις που καταλύουν στηρίζονται στον σίδηρο της ομάδας αίμης που φέρουν. Ο σίδηρος αυτός βρίσκεται συνήθως στη τρισθενή μορφή του ( $Fe^{3+}$ , ferric state). Όταν όμως

αναχθεί στην δισθενή μορφή του ( $\text{Fe}^{2+}$ , ferrous state), μπορεί να προσδέσει μόρια, όπως το μοριακό οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ) και το μονοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}$ ) (Hasler JA et al, 1999).

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα ένζυμα P450 καταλύουν αντιδράσεις υδροξυλίωσης για την οξειδωτική μετατροπή μιας χημικής ένωσης που ακολουθεί την εξίσωση που φαίνεται στο σχήμα 1.1.



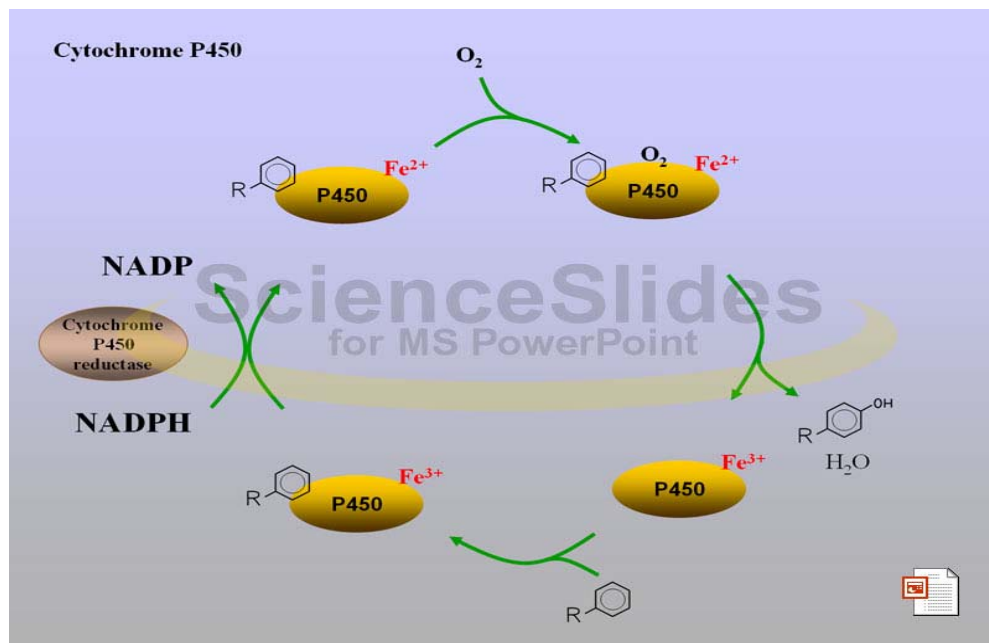
**Σχήμα 1.1.** Η εξίσωση των P450 εξαρτώμενων μεικτών-οξειγενασών αντιδράσεων

Δύο ηλεκτρόνια που προέρχονται από το NADPH, μεταφέρονται στην αιμοπρωτεΐνη από μια φλαβοπρωτεΐνη με την παρουσία ενός οργανικού χημικού και μοριακού οξυγόνου. Η οργανική χημική ένωση οξειδώνεται και ένα άτομο μοριακού οξυγόνου ενσωματώνεται στο χημικό προϊόν. Για το λόγο αυτό τα CYPs καλούνται και μονοοξυγενάσες (monooxygenases) για να διακριθούν από τις δυοοξυγενάσες (dioxygenases) οι οποίες και ενσωματώνουν στο υπόστρωμα τους και τα δύο άτομα του μοριακού οξυγόνου (Hasler JA et al, 1999).

Γενικά τα P450 υποβάλλονται σε μια κυκλική σειρά αντιδράσεων (εικόνα 1.13.) όπου: (α) ο τρισθενής σίδηρος της αιμοπρωτεΐνης αντιδρά με ένα χημικό μόριο για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο, (β) το σύμπλοκο μειώνεται κατά ένα ηλεκτρόνιο που μεταφέρεται από το NADPH, (γ) το νέο σύμπλοκο αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο για να σχηματίσει ένα τριμερές σύμπλοκο σιδηρούχου P450-υποστρώματος-οξυγόνου, (δ) το



τριμερές σύμπλοκο μειώνεται περαιτέρω κατά ένα ηλεκτρόνιο που μεταφέρεται από το NADPH. Αυτό δημιουργεί ένα ενδιάμεσο (που δεν έχει ακόμη αναγνωριστεί πλήρως) μειωμένο κατά δύο ηλεκτρόνια, όπου συμβαίνει μια μοριακή αναδιοργάνωση με αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του οξυγόνου στο υπόστρωμα του χημικού, (ε) το τελικό σύμπλοκο σταματά την αλληλεπίδραση δημιουργώντας ξανά το μη συμπλοκοποιημένο τρισθενή σίδηρο του P450 που μπορεί να συμμετέχει στο μεταβολισμό ενός άλλου χημικού μορίου.



Εικόνα 1.13. Η κυκλική σειρά αντιδράσεων των P450 ([www.scielo.cl](http://www.scielo.cl))

#### 1.2.4. Ονοματολογία της υπερ-οικογένειας των P450

Τα P450s κατηγοριοποιήθηκαν σε οικογένειες και υπο-οικογένειες με βάση την αρχή ότι «η αλληλουχία μιας πρωτεΐνης P450 από μια οικογένεια γονιδίων καθορίζεται συνήθως έχοντας <40% ομοιότητα με αυτή από κάθε άλλη οικογένεια». Οι υπο-οικογένειες ομαδοποίησαν τις πρωτεΐνες που είχαν ομοιότητα αλληλουχίας <60%. Όταν αυτές οι αρχές εφαρμόστηκαν στα γνωστά P450s, απαντάται μια σχέση δομής όπως φαίνεται στον πίνακα 1.4. Η εξέταση αυτής της μεθόδου κατηγοριοποίησης των P450s δείχνει ότι υπάρχουν τουλάχιστον 18 οικογένειες P450s και πολλές υπο-οικογένειες (42). Το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει βρεθεί ότι περιλαμβάνει 57 λειτουργικά CYP γονίδια και 58

ψευδογονίδια. Γονίδια διαφορετικών οικογενειών, υποδηλώνονται με ένα αραβικό αριθμό, π.χ. CYP1, ενώ υπο-οικογενειών με ένα κεφαλαίο λατινικό γράμμα π.χ. CYP1A ή CYP1B. Ο αριθμός ο οποίος καθορίζει το όνομα της οικογένειας καθορίζεται συνήθως από το πότε ανακαλύφθηκε η συγκεκριμένη οικογένεια. Μόνο για δύο οικογένειες, τις CYP21 και CYP17, ο αριθμός αυτός έχει ουσιαστική βιοχημική αξία καθώς πρόκειται τις 21-υδροξυλάσες στεροειδών και τις 17-υδροξυλάσες στεροειδών αντίστοιχα. Μεμονωμένα κάθε CYP ένζυμο ονομάζεται προσθέτοντας ακόμη έναν αραβικό αριθμό π.χ. CYP1A1 (Nelson, Koymans et al, 1996).

Τα ένζυμα των οικογενειών 1-3 δρουν κυρίως στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ενώ οι άλλες οικογένειες έχουν σημαντικές ενδογενείς λειτουργίες (Nebert DW et al, 2002). Μερικές από τις CYP πρωτεΐνες των οικογενειών 1-3 (Nelson DR, 2006) μεταβολίζουν επίσης ενδογενή συνθετικά μόρια, όπως οι στεροειδείς ορμόνες και το αραχιδονικό οξύ. Περίπου οι μισές από τις 57 CYP πρωτεΐνες ανήκουν στις οικογένειες 1-3. Οι λειτουργίες και οι καταλυτικές δραστηριότητες μερικών από αυτά τα ένζυμα είναι ακόμη άγνωστες.

Η πλειοψηφία των CYPs εκφράζεται στο ανθρώπινο ήπαρ, αλλά εκφράζονται επίσης και στους εξωηπατικούς ιστούς σε μικρότερη κλίμακα. Λίγες CYP πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των ξένων συνθετικών βρίσκονται μόνο στους εξωηπατικούς ιστούς (Raunio H et al, 1995). Η έκφραση επικεντρώνεται στο ήπαρ, εξαιτίας του ρόλου του ως μέσον εισόδου όλων των απορροφημένων ενώσεων. Άλλοι ιστοί, όπως ο πνεύμονας και η επιδερμίδα δρουν επίσης ως πρώτες γραμμές άμυνας εξωγενών συνθετικών, κάτι που εν μέρει εξηγεί την έκφραση των CYP ενζύμων σε αυτούς τους ιστούς.



Family	Number of			Substrates & Functions
	Subfamilies	Genes	Pseudogenes	
CYP1	2	3	1	Foreign chemicals and steroid (especially estrogen) metabolism
CYP2	13	16	16	Foreign chemicals and steroid metabolism
CYP3	1	4	2	Foreign chemicals and steroid (including testosterone) metabolism
CYP4	6	11	10	Arachidonic acid or fatty acid metabolism
CYP5	1	1	-	Thromboxane A <sub>2</sub> synthase
CYP7	2	2	-	Bile acid biosynthesis 7-alpha hydroxylase of steroid nucleus
CYP8	2	2	-	Prostacyclin synthase, bile acid biosynthesis
CYP11	2	3	-	Steroid biosynthesis
CYP17	1	1	-	Steroid biosynthesis: 17alpha-hydroxylase
CYP19	1	1	-	Steroid biosynthesis: aromatase synthesizes estrogen
CYP20	1	1	-	Unknown function
CYP21	2	2	1	Steroid biosynthesis
CYP24	1	1	-	Vitamin D degradation
CYP26	3	3	-	Retinoic acid hydroxylase
CYP27	3	3	-	Bile acid biosynthesis, vitamin D <sub>3</sub> 1-alpha hydroxylase
CYP39	1	1	-	7-alpha hydroxylation of 24-hydroxycholesterol
CYP46	1	1	-	Cholesterol 24-hydroxylase
CYP51	1	1	3	Cholesterol biosynthesis: lanosterol 14-alpha demethylase

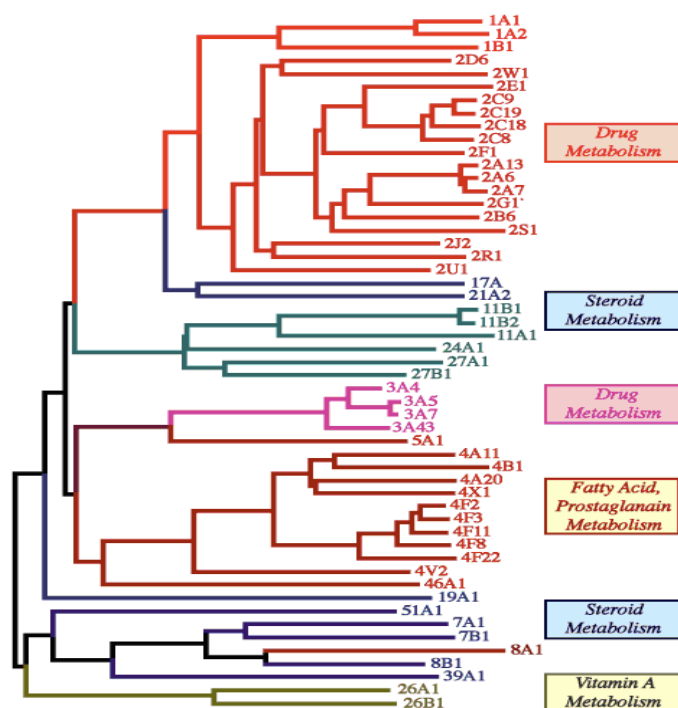
**Πίνακας 1.4.** Οι οικογένειες CYP γονιδίων στον άνθρωπο, τα υποστρώματα τους και οι κύριες λειτουργίες τους (Nelson DR et al, 2004)

### 1.2.5. Εξελικτική Πορεία των CYPs

Η γένεση της υπερ-οικογένειας του κυτοχρώματος P450 έγκειται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, πριν την έλευση των ευκαρυωτικών και πριν την συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου στην ατμόσφαιρα. Η ποικιλία της προέκυψε κυρίως από μια εκτεταμένη διαδικασία διπλασιασμού των γονιδίων. Πιθανές όμως είναι και οι περιπτώσεις αναστροφών και αμοιβαίων μεταθέσεων, αλλά αυτές δεν είναι ακόμη καλά τεκμηριωμένες (Reichhart D et al, 2000).

Εάν εξεταστεί προσεκτικά το φυλογενετικό δένδρο των CYPs και συσχετισθεί με τις καταλυτικές τους δραστηριότητες, πολλές υποθέσεις μπορούν να γίνουν όσον αφορά την εξελικτική τους πορεία (εικόνα 1.14.). Τα πρώτα CYPs που φαίνεται να εμφανίστηκαν στα θηλαστικά είναι εκείνα τα οποία μεταβολίζουν τα στεροειδή και τα λιπαρά οξέα, ενώ

αργότερα ακολούθησαν και αυτά που μεταβολίζουν τις ξενοβιοτικές ουσίες. Τα τελευταία επέτρεψαν έτσι στους οργανισμούς αυτούς να επιβιώνουν σε εχθρικά περιβάλλοντα (Nelson DR et al, 1987).



Εικόνα 1.14. Φυλογενετικό δένδρο των CYP γονιδίων του ανθρώπου (Gotoh O, 2002)

### 1.2.6. Ο ρόλος κλειδί των P450 στην ανθρώπινη βιολογία και τα ιατρικά θεραπευτικά

Τα P450s συμμετέχουν σε ρόλους κλειδιά απαραίτητους για τη διατήρηση της υγείας και της ευημερίας ενός ατόμου. Η μεγαλύτερη ερευνητική έμφαση εστιάζει τον ρόλο που παίζουν τα P450s στον μεταβολισμό των φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών και στην ικανότητα κάποιων χημικών να προκαλούν καρκίνο.

Σε πολλές περιπτώσεις ο σχηματισμός χημικών με υψηλή ηλεκτρονιοφιλικότητα που απαιτείται για τη σύνδεση με το DNA κατά τον οξειδωτικό μεταβολισμό πραγματοποιείται από τα P450s. Η ενεργοποίηση των διολ-εποξειδίων των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και ο μεταβολισμός των νιτροσαμίνων είναι παραδείγματα

όπου τα P450 της οικογένειας CYP1A είναι βασικά για την ενεργοποίηση των ενεργών μεταβολιτών.

Ένα δεύτερο μονοπάτι στο οποίο τα P450s μπορούν να συνεισφέρουν στη διαφοροποίηση των κυτταρικών μακρομορίων, οδηγώντας σε τοξική απόκριση ή σε μια κυτταρική βλάβη είναι μέσω του σχηματισμού ιδιαίτερα ενεργών ελεύθερων ριζών όπως οι ρίζες υπεροξειδίου ή υδροξυλίου, οι οποίες προκύπτουν ως υποπροϊόντα των αντιδράσεων των P450s. Μια μεγάλη πρόκληση σήμερα είναι η ανάπτυξη μεθόδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόβλεψη δημιουργίας τοξικών (ή καρκινογενετικών) μεταβολιτών που σχηματίζονται κατά το μεταβολισμό από τα P450s.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανόηση των ποικίλων αποκρίσεων στα θεραπευτικά φάρμακα. Έχει αναγνωριστεί ότι κάποια άτομα είναι γρήγοροι μεταβολίτες για κάποια φάρμακα, ενώ άλλα είναι αργοί μεταβολίτες. Η διαφορετική απόκριση οφείλεται, σε πολλές περιπτώσεις, σε διαφορές στην ποσότητα των P450s που εκφράζεται στο έντερο και στο ήπαρ. Η επίδραση της διαίτας, πριν από την έκθεση σε άλλα φάρμακα που ίσως λειτουργούν ως «υποκινητές» και προσωπικές συνήθειες όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ, είναι αιτίες για την αλλαγή του επιπέδου της έκφρασης των P450s. Πιο πρόσφατα στην εποχή της γενετικής ιατρικής, η παρουσία πολυμορφικών μορφών των P450s με τροποποιημένες δραστηριότητες έχει αναγνωριστεί και λειτουργεί ως βάση των διαφορών στην απόκριση σε ένα φάρμακο.

### **1.2.7. *TBXAS1 thromboxane A synthase 1 (CYP5A1)***

Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα μέλος της υπεροικογένειας ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Οι πρωτεΐνες του κυτοχρώματος P450 είναι μονο-οξυγενάσες οι οποίες καταλύουν πολλές αντιδράσεις που συμμετέχουν στον μεταβολισμό φαρμάκων και στη σύνθεση της χοληστερόλης, των στεροειδών και άλλων λιπιδίων. Εντούτοις, αυτή η πρωτεΐνη θεωρείται μέλος της υπεροικογένειας του κυτοχρώματος P450 λόγω

της ομοιότητας της αλληλουχίας παρά της λειτουργικής ομοιότητας. Το ένζυμο παίζει ρόλο σε διάφορες παθοφυσιολογικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένων της ομοιόστασης, της καρδιαγγειακής ασθένειας και του εγκεφαλικού επεισοδίου. Αυτό το γονίδιο εκφράζει δύο μεταγραφικούς πολυμορφισμούς (Ulrich CM, 2005).

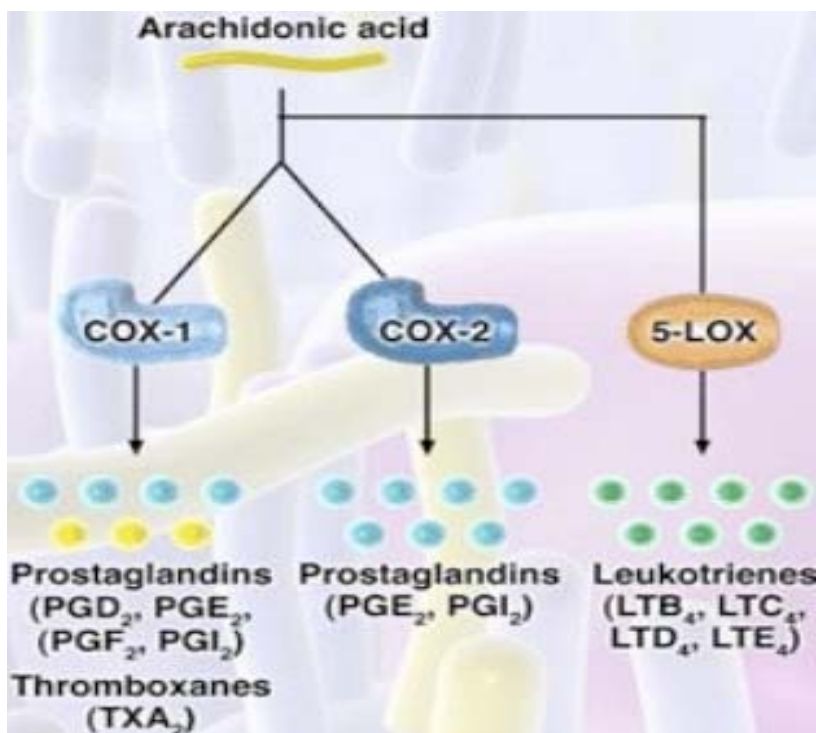
Επίσημος συμβολισμός:	TBXAS1
--------------------------	--------

Name	thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450, family 5, subfamily A)
------	--

**Πίνακας 1.5.**

Η συνθετάση της θρομβοζάνης, ένα ένζυμο του κυτοχρώματος P450, είναι μια ενδοπλασματική δικτυωτή μεμβρανική πρωτεΐνη που καταλύει την μετατροπή της ενδοπεροξειδικής προσταγλανδίνης H<sub>2</sub> σε θρομβοζάνη A<sub>2</sub>, έναν ισχυρό αγγειοσυστολέα

κυκλοοξυγενάση (COX) μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε ασταθή ενδοπεροξειδικά προϊόντα PGG<sub>2</sub> και PGH<sub>2</sub> που μετασχηματίζονται σε προσταγλανδίνες PGD<sub>2</sub> και PGI<sub>2</sub> (προστακυκλίνη) όπως και θρομβοξάνες. Παράλληλα, η 5-λιπooξυγενάση μετασχηματίζει το αραχιδονικό οξύ σε διάφορα υδροξυπαράγωγα του εικοσανοϊκού οξέος, τα οποία τελικά αποδίδουν λευκοτριένια (LTB<sub>4</sub>) (εικόνα 1.15) (Needleman P et al, 1986).



Εικόνα 1.15. Η μεταβολική οδός του αραχιδονικού οξέος

Μαζί με την προστακυκλίνη, η θρομβοξάνη A<sub>2</sub> παίζει κεντρικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης (Pareti FI et al, 1980). Η ασπιρίνη είναι ένα αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα στη δευτερογενή πρόληψη ισχαιμικών ΑΕΕ (Chen ZM et al, 2000) αλλά και στην πρωτογενή, σε άτομα με πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου (Hayden M et al, 2002). Η ασπιρίνη δρα αναστέλλοντας την κυκλοοξυγενάση των αιμοπεταλίων, οπότε μειώνεται και η παραγωγή της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> (Moncada S et al, 1999). Η αντιθρομβωτική δράση της ασπιρίνης, έρχεται ως άμεσο επακόλουθο της ισχυρής αναστολής της COX-1, ενώ η ενοχοποίηση

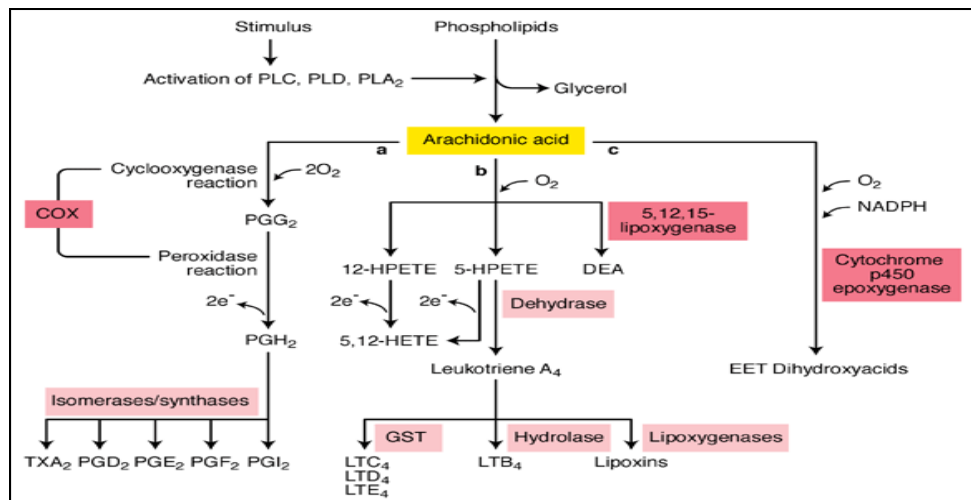
των εκλεκτικών-σε θεραπευτικές δόσεις-αναστολέων της COX-2 βρίσκει βάση στην αναστολή της σύνθεσης των προσταγλανδινών με αντισυγκολλητική ως προς τα αιμοπετάλια δράση.

Επομένως η θρομβοξάνη  $A_2$ , η οποία ευνοεί τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την αγγειοσύσπαση, έχει εκ διαμέτρου αντίθετη βιολογική δράση με την προστακυκλίνη, η οποία αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων στην αγγειακή πληγή και έχει αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες (Moncada S et al, 1979). Οι δύο αυτές δραστικές ουσίες προέρχονται από κοινή μεταβολική οδό. Σε περίπτωση τραυματισμού αγγείου μειώνεται τοπικά η παραγωγή της συνθετάσης της προστακυκλίνης και προάγεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς υπερισχύει η δράση της θρομβοξάνης  $A_2$  (Moncada S et al, 1979) (εικόνα 1.16). Φυσιολογικά, στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ θρομβοξάνης και προστακυκλίνης που εξασφαλίζει την αποφυγή εμφάνισης θρόμβων ως προς αυτό το επίπεδο. Η θρομβοξάνη παράγεται στα αιμοπετάλια μέσω της COX-1, προκαλώντας συσσώρευση αιμοπεταλίων και δημιουργία θρόμβου. Η προστακυκλίνη δρα αντιρροπιστικά στο αγγειακό ενδοθήλιο όπου παράγεται μέσω της COX-1 και COX-2 και προκαλεί αγγειοδιαστολή, διευκολύνοντας την κυκλοφορία του αίματος.

Το *CYP5A1* είναι το μοναδικό έως σήμερα γνωστό μέλος της ομάδας 5 της υπεροικογένειας του κυτοχρώματος P450 (Nelson DR et al, 1993). Παρότι έχει τα βασικά κοινά δομικά χαρακτηριστικά των υπολοίπων ενζύμων του κυτοχρώματος P450, δεν εμφανίζει δραστικότητα μονοοξυγενάσης (Nusing R et al, 1990). Με βάση τα τρέχοντα δεδομένα, είναι το μοναδικό ένζυμο του συστήματος P450 που συμμετέχει στο μεταβολικό μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος (Hsu PY et al, 1999).

Ο πλήρης μηχανισμός με τον οποίο η πρωτεΐνη CYP5A1 επιτελεί τη λειτουργία της, καθώς και ο ακριβής τρόπος σύνδεσης με τα υποστρώματα, δεν είναι ακόμη επακριβώς γνωστοί. Γεγονός είναι πάντως ότι σε κλινικό επίπεδο ανεπάρκεια

δραστικότητας του ενζύμου σχετίζεται με μέτρια έως βαρεία αιμορραγική διάθεση (Mestel F et al, 1980). Επιπλέον, φαίνεται ότι το ένζυμο εμπλέκεται και σε λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης CYP5A1 έχουν ανευρεθεί στο σπλήνα, στο θύμο αδένα και σε πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα (Zhang L et al, 1993).



**Εικόνα 1.16.** Τα τρία σημαντικότερα μονοπάτια που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Το μονοπάτι της κυκλοοξυγενάσης (COX) έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό προσταγλανδίνης G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) από αραχιδονικό οξύ με μία αντίδραση κυκλοοξυγενάσης. Σε μία συνεπακόλουθη αντίδραση περοξειδάσης, η PGG<sub>2</sub> υποβάλλεται σε μείωση δύο ηλεκτρονίων και γίνεται PGH<sub>2</sub>. Και οι δύο αυτές αντιδράσεις καταλύονται από το COX (prostaglandin synthase H). Η PGG<sub>2</sub> είναι υπόστρωμα για της κυτταρο-ειδικές ισομεράσεις και συνθάσεις, παράγοντας άλλα εικοσανοειδή όπως η προστακυκλίνη (PGI<sub>2</sub>) και η θρομβοξάνη A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Expert reviews in Molecular Medicine 2003 Cambridge University available at [www-ermm.cbcu.cam.ac.uk](http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk)

### 1.2.7.1. Γονιδιακή δομή και πολυμορφισμοί του ανθρώπινου γονιδίου που κωδικοποιεί την συνθάση της θρομβοξάνης

Το γονίδιο *CYP5A1*, που κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη, έχει αναγνωριστεί (Tazawa R et al, 1996). Πρώτος ο Nebert το 1994 έδειξε ότι το γονίδιο συνθάση της θρομβοξάνης A, ως γονίδιο του κυτοχρώματος P450, συμβολίζεται CYP5. Αποτελείται από 13 εξώνια και 12 εσώνια, εμφανίζοντας μέγεθος της τάξεως των 150Kb. Πρόσφατα περιγράφηκαν 11 πολυμορφισμοί του γονιδίου σε σειρά Γάλλων υγιών εθελοντών (Chevalier et al, 2001). Συνολικά το 10% περίπου των υγιών ενηλίκων παρουσιάζει κάποια από τις 11 σημειακές μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί, 8 εκ των οποίων καταλήγουν σε αλλαγή του αμινοξέος που κωδικοποιείται (*missense mutations*): **R61H**,

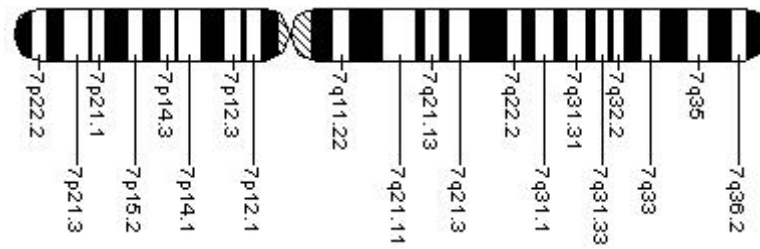


**D161E, N246S, L357V, Q417E, E450K, T451N** και **R466Q**. Είναι γνωστό ότι το *CYP5A1* υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα (*alternate splicing*), με έλλειψη μεταγραφής του εξωνίου 12, υπευθύνου για τη σύνδεση της αίμης στο ένζυμο, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη που προκύπτει να στερείται ενζυμικής δραστηριότητας (Wang LH, 1994).

Η λειτουργική σημασία των πολυμορφισμών του *CYP5A1* δεν είναι έως τώρα σαφής, καθώς μόλις πρόσφατα αναγνωρίστηκαν (Chevalier et al, 2001). Οι Baek et al, 1996, βασιζόμενοι σε ανάλυση Southern, ανέφεραν ότι το γονίδιο *CYP5A1* θεωρείται γονίδιο single-copy, δηλαδή το ανθρώπινο απλοειδές γονιδίωμα περιέχει ένα μονό αντίγραφο του γονιδίου TS. Αν και χρησιμοποιούνται πολλαπλά σημεία έναρξης της μεταγραφής, η μεταγραφή του *CYP5A1* είναι αρχικά TATA-εξαρτώμενη. Μία δινουκλεοτιδική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (CA) που ταυτοποιείται στο ένατο ιντρόνιο του γονιδίου εκφράζει τον αλληλικό πολυμορφισμό. Τουλάχιστον τέσσερα συγκεκριμένα αλληλόμορφα, που περιέχουν 13 με 20 αντίγραφα των επαναλήψεων CA, έχουν ανιχνευτεί.

Οι πολυμορφισμοί παρατηρούνται σε συγκεκριμένες μόνο περιοχές του γονιδίου (π.χ. εξώνια 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12) γεγονός με λειτουργική ενδεχομένως σημασία. Επιπλέον, τρεις πολυμορφικές θέσεις αφορούν κωδικόνια που σχετίζονται άμεσα με την περιοχή σύνδεσης των υποστρωμάτων του ενζύμου (Chevalier et al, 2001).

Το γονίδιο *CYP5A1* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7. Χρησιμοποιώντας διπλής χρώσης φθορίζοντα in situ υβριδισμό (fluorescence in situ hybridization, FISH), οι Chase et al. 1993, τοποθέτησαν το γονίδιο *CYP5A1* στο 7q34-q35. Με FISH, οι Miyata et al, το 1994 χαρτογράφησαν το *CYP5A1* γονίδιο στο 7q33-q34. Στο 7q34 είναι η καλύτερα εκτιμώμενη θέση του γονιδίου (εικόνα 1.17.).



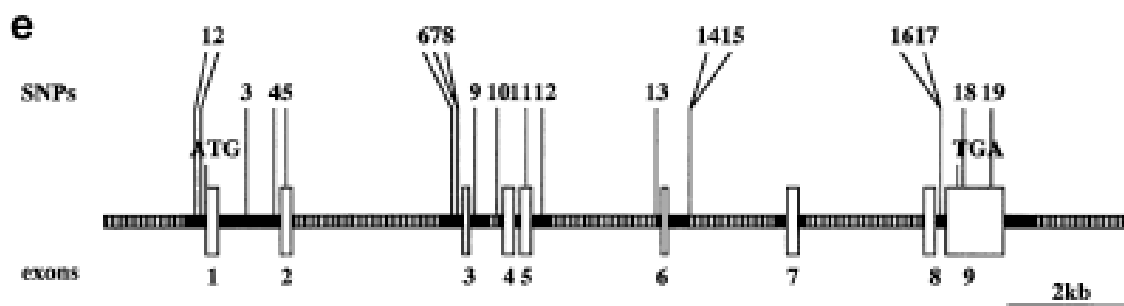
**Εικόνα 1.17.** Ιδεόγραμμα του χρωμοσώματος 7, όπου εδράζεται το γονίδιο *CYP5A1* (ghr.nlm.nih.gov)

Στην έρευνά μας ασχοληθήκαμε συγκεκριμένα με τον πολυμορφισμό του **εξωνίου 12** με την πολυμορφική περιοχή **1397G>A**, όπου στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο γονίδιο ***CYP5A1\*9*** γίνεται η μετάλλαξη με την αδενίνη που αντικαθιστά τη γουανίνη (πίνακας 1.6, 1.7) Εικόνα 1.18).

**Πίνακας 1.6.** Εντοπισμός των SNPs στο γονίδιο *CYP5A1*

Γονίδιο CYP	Σύνολο γενετικών παραλλαγών	SNPs	Πολυμορφισμοί ένθεσης/	Novel	Σύνολο αλληλουχημένων ζευγών βάσεων (Kb)	Συχνότητα (bp/1 SNP)
CYP2A6	22	22	0	13	4.8	218
CYP2A13	15	15	0	11	6.7	447
CYP2B6	24	24	0	14	7.0	292
CYP2E	42	40	2	18	11.9	298
CYP2S1	19	14	5	9	6.5	464
<b>CYP5A1</b>	<b>158</b>	<b>137</b>	<b>21</b>	<b>87</b>	<b>86.5</b>	<b>631</b>
CYP7A1	18	16	2	13	9.0	563
CYP7B1	21	16	5	18	21.3	1331
Total (CYP)	319	284	35	183	153.7	(average) 541

**Εικόνα 1.18.**



Πίνακας 1.7.

Αλληλόμορφο	Πρωτεΐνη	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Αποτέλεσμα
CYP5A1*9	CYP5A1.9	1397 G>A	R466Q

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Συλλογή Δειγμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν μια ομάδα ασθενών και μια ομάδα μαρτύρων. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από δύο νοσοκομεία από δύο διαφορετικά γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας. Από την Γ΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του Νοσοκομείου Αθηνών <<Σωτηρία>> και την Νευρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Κρήτης <<Βενιζέλειο-Πανάνειο>>. 237 ασθενείς εισήχθησαν με διάγνωση ΑΕΕ ή παροδικού ΑΕΕ (ΤΙΑ) σύμφωνα με την ΑΤ (αξονική τομογραφία) που έγινε εντός του 24ώρου και την επιβεβαιωτική εντός των 72ωρών και συμπληρωματικά MRI (μαγνητική τομογραφία) όπου κρίθηκε απαραίτητο. Έγινε προσπάθεια ένταξης όσο το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού ασθενών στη μελέτη, ομοιόμορφα κατανομημένων μεταξύ των δύο κέντρων. Επίσης στη μελέτη μας συμπεριλαμβάνεται μια ομάδα 71 ασθενών που έπαθαν ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ (ΤΙΑ) ενώ έπαιρναν προληπτικά ασπιρίνη και συγκρίθηκαν με ασθενείς

που μετά από ΑΕΕ και δευτερογενή πρόληψη με ασπιρίνη δεν είχαν ξαναπαρουσιάσει επεισόδιο. Απαραίτητη ήταν η έγγραφη συναίνεση από τον ασθενή ή τους οικείους του για τη διενέργεια των διαγνωστικών αιμοληψιών. Η μελέτη ήταν προοπτική, καθώς οι ασθενείς παρακολουθούνταν ως προς την έκβασή τους για τουλάχιστον ένα έτος από την ένταξή τους στη μελέτη (Σεπτέμβριος 2003-Αύγουστος 2004). Στην αρχή περίπου 511 ασθενείς θεωρήθηκαν ότι μπορούν να συμπεριληφθούν στη μελέτη, από τους οποίους όμως 58 ασθενείς ήταν με διάγνωση υπαραχνοειδούς αιμορραγίας, 70 με διάγνωση άλλης νόσου του ΚΝΣ και 146 με άλλες παθήσεις, οι οποίοι και δεν συμπεριλήφθηκαν.

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη αποτέλεσαν:

1) Εσφαλμένη διάγνωση εργασίας, όπως αποδεικνύεται από ανάδειξη άλλης νόσου στην ΑΤ (π.χ. εγκεφαλικής μετάστασης) ή από διαφορετική τελική διάγνωση (π.χ. απομόνωση μικροβιακού παράγοντα σε καλλιέργειες).

2) Διάγνωση λοίμωξης ΚΝΣ.

3) Διάγνωση υπαραχνοειδούς αιμορραγίας.

4) Συνύπαρξη άλλης χρόνιας νόσου του ΚΝΣ, στην οποία ενδέχεται να οφείλεται η νευρολογική εικόνα του ασθενούς (π.χ. νόσος Πάρκινσον, σκλήρυνση κατά πλάκας, πλαγία μυοατροφική σκλήρυνση, κ.α.).

5) Ασθενείς που έπερναν άλλου είδους εκτός από ασπιρίνη αντιαιμοπεταλιακή και αντιπηκτική θεραπεία (καρδιαγγειακά επεισόδια).

6) Σε σχέση με το ρόλο της ασπιρίνης αποκλείστηκαν οι ασθενείς με ιστορικό κολπικής μαρμαρυγής, όπου ο μηχανισμός του εγκεφαλικού επεισοδίου είναι διαφορετικός και δεν ενδείκνεται η θεραπεία με ασπιρίνη.

Τα εξής στοιχεία από το ιστορικό καταγράφηκαν σε μια βάση δεδομένων:

α) ηλικία,

β) φύλο,

γ) οικογενειακό ιστορικό (ΑΕΕ, στεφανιαίας νόσου ή περιφερικής αρτηριοπάθειας),

δ) ύπαρξη των εξής προδιαθεσικών παραγόντων (κάπνισμα, αρτηριακή υπέρταση, κολπική μαρμαρυγή, σακχαρώδης διαβήτης, υπερλιπιδαιμία)

ε) ύπαρξη αγγειακής ή στεφανιαίας νόσου (ιστορικό με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου ΟΕΜ ή αορτοστεφανιαίας παράκαμψης ή θετική δοκιμασία κόπωσης ή θετικό σπινθηρογράφημα με Θάλιο), ιστορικό διαλείπουσας χωλότητας ή γνωστές αθηρωματικές αλλοιώσεις καρωτίδων, σπονδυλοβασικού συστήματος, αρτηρίας ή άλλων αρτηριών.

ζ) σημειώθηκε η προληπτική ή η θεραπευτική φαρμακευτική παρέμβαση με λήψη ασπιρίνης καθώς η δοσολογία και η χρονική διάρκεια.

Έγινε κατάταξη των ΑΕΕ με βάση το διαγνωστικό σύστημα TOAST. Η ταξινόμηση αυτή, περιλαμβάνοντας τόσο αιτιολογικά όσο και μορφολογικά κριτήρια, θεωρείται η περισσότερο αξιόπιστη από όσες έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες. Σε ό,τι αφορά τα θρομβοεμβολικά ΑΕΕ, κρίθηκε απαραίτητη η περαιτέρω διάκριση σε τέσσερις κατηγορίες, με βάση μορφολογικά κριτήρια (τα απεικονιστικά ευρήματα στην ΑΤ και καθορισμένα κλινικά χαρακτηριστικά), καθώς οι υποκατηγορίες αυτές έχουν διαφορετική φυσική ιστορία και πρόγνωση. Η αντιμετώπιση των ασθενών στην οξεία φάση έγινε με βάση τις συστάσεις της επιτροπής για τα ΑΕΕ της Αμερικανικής Καρδιολογικής Εταιρείας.

Επίσης συμπεριλήφθησαν 171 μάρτυρες με ελεύθερο ιστορικό. Ως μάρτυρες ορίστηκαν φαινομενικά υγιή άτομα στο γενικό πληθυσμό, τα οποία δεν είχαν από το ατομικό τους αναμνηστικό επεισόδιο συμβατό με ΑΕΕ ή ΤΙΑ. Επιλεχθήκαν κυρίως από τα τμήματα αιμοδοσίας των νοσοκομείων της μελέτης. Έγινε προσπάθεια να αντιστοιχούν κατά το δυνατόν περισσότερο με τους ασθενείς στα δημογραφικά χαρακτηριστικά. Έγινε καταγραφή και για τους μάρτυρες η ύπαρξη προδιαθεσικών παραγόντων, αθηρωμάτωσης ή περιφερικής αγγειοπάθειας και το οικογενειακό ιστορικό, όπως ακριβώς και για τους ασθενείς. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού φαίνονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Τα κύρια χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού.  
Ο πίνακας είναι από το δημοσιευμένο paper αυτής της μελέτης, Kimouli et al, 2009.

---

<b>Patients N=237</b>	<b>Controls N=171</b>	<b>P value</b>
-----------------------	-----------------------	----------------

---

---

<b>Mean age (Range)</b>	77.3 (47-99)	76.8 (43-96)	NS
-------------------------	--------------	--------------	----

**One (%)**

50 (21.1)

39 (22.8)



---

<b>More than one (%)</b>	175 (73.8)	122 (71.4)	
--------------------------	------------	------------	--

<b>Hypertension (%)</b>	193 (81.4)	133 (77.8)	NS
-------------------------	------------	------------	----

<b>Diabetes (%)</b>	92 (38.8)	56 (32.7)	NS
---------------------	-----------	-----------	----

---

---

<b>Dyslipidemia<sup>2</sup> (%)</b>	83 (35)	62 (36.2)	NS
<b>Total chol. mmol/L (mean±SD)</b>	6.6 (3.8)	6.4 (3.9)	NS

**LDL-chol. mmol/L**  
**(mean±SD)**

4.4 (3)

---

4.1 (3.1)

NS

**TIA**

28 (11.8)

NA

---

**LVD**

94 (39.7)

NA

**SVD**

82 (34.6)

NA

<b>IU</b>	33 (13.9)	NA
<b>No</b>	166 (70)	

<b>100 mg/day</b>	15 (6.3)	NA
-------------------	----------	----

<b>160 mg/day</b>	27 (11.4)	NA
-------------------	-----------	----

<b>325 mg/day</b>	29 (12.3)	NA
-------------------	-----------	----

---

<sup>1</sup> δηλώνει τους προδιαθεσικούς παράγοντες για εγκεφαλοαγγειακή νόσο: κάπνισμα, υπέρταση, διαβήτης, σισλιπιδεμία.

<sup>2</sup> η παρουσία ενός από τα παρακάτω: φαρμακευτική αγωγή, ολική χοληστερόλη > 6.2 mmol/L, LDL-χοληστερόλη > 4.1 mmol/L.

<sup>3</sup> περιλαμβάνει AEE ή παροδικό AEE (TIA)

CVA: cerebrovascular attack, NA: not available, NS: not statistically significant.

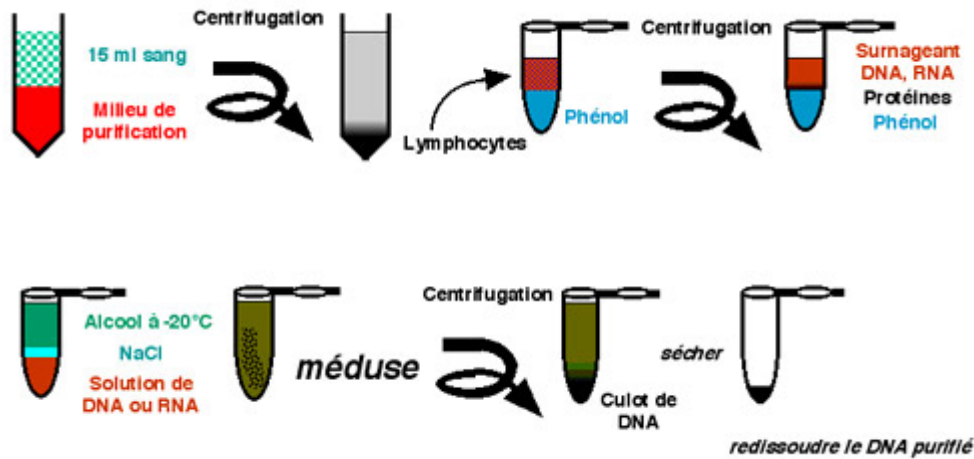
<sup>4</sup> Σύμφωνα με το TOAST διαγνωστικό σύστημα: LVD, large-vessel disease; SVD, small-vessel disease; IU, ischemic stroke of undetermined etiology. Ασθενείς με καρδιοεμβολικά επεισόδια, αιμορραγικά εγκεφαλικά ή εγκεφαλικά άλλης αιτιολογίας έχουν αποκλειστεί από την μελέτη μας.

## **2.2. Επεξεργασία δειγμάτων – Μέθοδοι**

- Απομόνωση του γενομικού DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια, καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα.
- Οι συγκεντρώσεις και η καθαρότητα των δειγμάτων DNA μετρήθηκαν φασματομετρικά (Hitachi Model U-2001 UV/Vis φασματόμετρο).
- Σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές (primers) με βάση την μεθοδολογία της allele specific PCR, για το exon 12 του γονιδίου *CYP5A1*, οι οποίοι εντοπίζουν τον πολυμορφισμό *CYP5A1*\*9 όπου γίνεται η αντικατάσταση 1397 G>A (R466Q).
- Ακολούθησε πολλαπλασιασμός του DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).
- Όλα τα PCR προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v).
- Στάλθηκαν τα δείγματα για sequencing για να αποκλείσουμε περίπτωση να έχουμε μη-ειδική (non-specific) υβριδοποίηση των εκκινητών. Αποδείχθηκε ότι τα PCR προϊόντα ήταν τα αναμενόμενα.

### **2.2.1. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα**

Συλλέγονται περίπου 5ml περιφερικού αίματος σε σωληνάριο με αντιπηκτικό (K-Na EDTA) και διατηρούνται σε θερμοκρασία 4°C. Γίνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με επώαση του αίματος σε 15ml ρυθμιστικού διαλύματος (Reagent A). Ακολουθεί ήπια ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 3000rpm για



**Εικόνα 2.1.** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου που εφαρμόζεται για την απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα ([www.chups.jussieu.fr](http://www.chups.jussieu.fr))

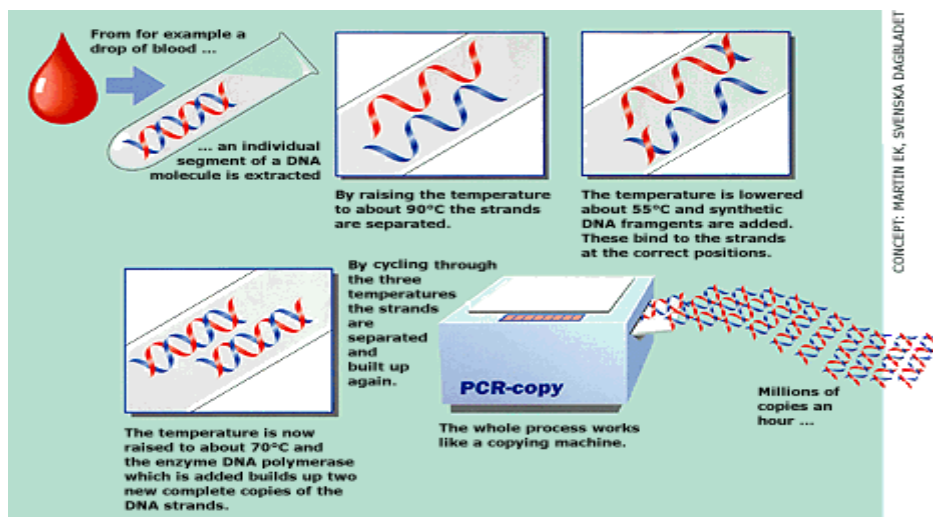
Στη συνέχεια προστίθενται 200μl  $\text{NaClO}_4$  και το διάλυμα επωάζεται στους  $65^\circ\text{C}$  για 20 λεπτά. Ακολουθεί εκχύλιση του DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο. Αυτή γίνεται σε 2 στάδια με το πρώτο να προστίθεται στο διάλυμα 200μl φαινόλης και 200μl χλωροφορμίου και να ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη λήψη του υπερκειμένου ακολουθεί το δεύτερο στάδιο, όπου γίνεται προσθήκη 500μl χλωροφορμίου ακολουθούμενη από άλλη μία φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Μετά την λήψη και πάλι του υπερκειμένου, το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 1000μl απόλυτης αιθανόλης και το μείγμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία  $-20^\circ\text{C}$  για περίπου 12 ώρες. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού γίνεται φυγοκέντρηση στους  $4^\circ\text{C}$  στις 13000rpm για 15 λεπτά, έκπλυση του κατακρημνισμένου DNA με 70% αιθανόλη και επανάληψη της φυγοκέντρησης. Το DNA, αφού στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε 100μl δις απεσταγμένου νερού ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) στους  $4^\circ\text{C}$  και έπειτα φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$ . Από αυτά ετοιμάζονται διαλύματα εργασίας με 10 πλάσια αραίωση σε δις απεσταγμένο νερό.

Reagent A: 10mM Tris-Base, 320mM Σουκρόζη, 5mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , pH 8.0 με προσθήκη αραιού HCl, 1% Triton-X100, θερμοκρασία δωματίου (RT)

Reagent B: 400mM Tris-Base, 60mM EDTA, 150mM NaCl, pH 8.0, 1% SDS, Autoclave Solution (αποστείρωση για 20 λεπτά), RT  $NaClO_4 \cdot H_2O$ : 5M, RT

### 2.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Από όλες τις τεχνικές που υπάρχουν για την ανάλυση του DNA και του RNA, καμία δεν είχε τέτοιον αντίκτυπο και τόσες δυνατότητες όσο μια εννοιολογικά απλή μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1985 από τον Mullis et al, (Saiki et al, 1985), η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR (Polymerase Chain Reaction) (εικόνα 2.2).



**Εικόνα 2.2.** Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθείται κατά την απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα και του πολλαπλασιασμού ενός αντιγράφου μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Χρειάζονται δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται σαν εκκινητές (primers). Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια έχουν διαφορετική αλληλουχία και είναι



συμπληρωματικά ως προς τις αλληλουχίες-στόχους των αλυσίδων DNA, εκατέρωθεν του τμήματος που θα πολλαπλασιαστεί.

Το DNA πρέπει πρώτα να αποδιαταχθεί με θέρμανση παρουσία μεγάλης μοριακής περισσειας καθενός από τα δύο ολιγονουκλεοτίδια και των τεσσάρων dNTPs. Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται κατόπιν μέχρι τη θερμοκρασία που επιτρέπει την υβριδοποίηση των εκκινητών με τις αλληλουχίες στόχους.

Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης του εκκινητή με την αλληλουχία-στόχο χαρακτηρίζει κάθε ζεύγος εκκινητών και γενικά είναι 3-10°C μικρότερη από την θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των εκκινητών. Εκκινητές με υψηλό ποσοστό GC (υψηλό  $T_m$ ) υβριδοποιούνται σε θερμοκρασίες πάνω από 55°C. Χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης (<50°C) ευνοούν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων, λόγω εκτοπικής πρόσδεσης των εκκινητών PCR. Η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) εξαρτάται από την αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου και υπολογίζεται με τον τύπο:

$$T_m = [2^\circ\text{C} \times (A+T)] + [4^\circ\text{C} \times (G+C)].$$

Μετά την υβριδοποίηση επιμηκύνεται η αλυσίδα με την DNA πολυμεράση. Ο κύκλος αυτός αποδιάταξης, υβριδοποίησης και DNA σύνθεσης επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Τα προϊόντα κάθε κύκλου πολλαπλασιασμού χρησιμοποιούνται σαν μήτρα για τον επόμενο, έτσι κάθε κύκλος ουσιαστικά διπλασιάζει το ποσόν του παραγόμενου DNA.

Συγκεκριμένα, αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA περίπου στους 93-95°C για 5 λεπτά και ακολουθούν 30-35 (επαναλήψεις) των σταδίων: αποδιάταξη (93-95°C), υβριδισμός των εκκινητών (55-60°C) και πολυμερισμός (72°C) διάρκειας περίπου 30-60 δευτερόλεπτα το καθένα. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση  $N = n(1+e)^c$ , όπου N είναι η τελική ποσότητα του προϊόντος, n είναι η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e η απόδοση της αντίδρασης και c ο αριθμός των κύκλων της PCR. Το κύριο προϊόν αυτής

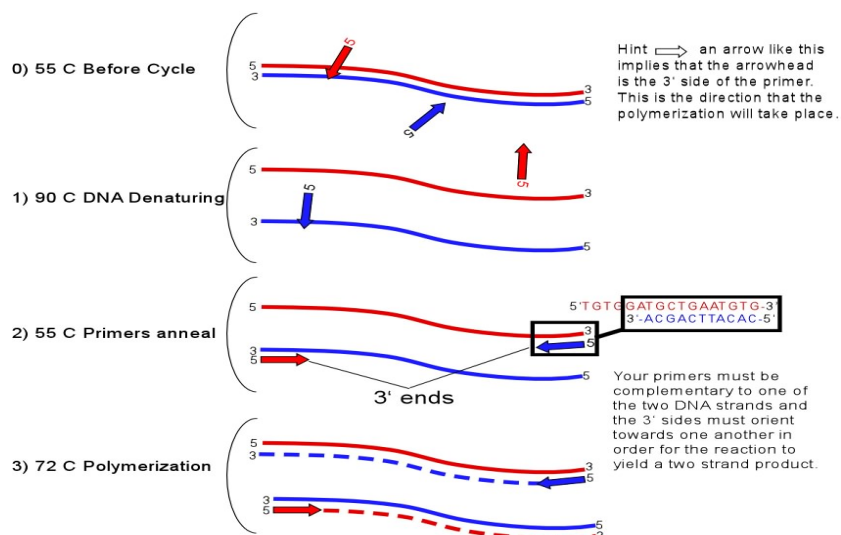
της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα κομμάτι δίκλωνου DNA που τα άκρα του καθορίζονται από το 5'-άκρο του εκκινητή και το μέγεθός του από την απόσταση των δύο εκκινητών.

Τα αρχικά πρωτόκολλα για PCR χρησιμοποιούσαν το τμήμα Klenow της *E. coli* DNA πολυμεράσης για την επιμήκυνση του DNA, επειδή όμως το ένζυμο αυτό απενεργοποιείται στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA έπρεπε σε κάθε κύκλο να προστίθεται καινούρια ποσότητα ενζύμου που δημιουργούσε πρόβλημα. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με την απομόνωση μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης, της Taq πολυμεράσης από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Το ένζυμο αυτό δεν επηρεάζεται από τις παρατεταμένες και συνεχείς επώσεις στους 95°C και έτσι δεν χρειάζεται να αντικαθίσταται σε κάθε κύκλο.

Μέσα σε λίγες ώρες μπορούν να δημιουργηθούν πολλά εκατομμύρια αντιγράφων της αρχικής αλληλουχίας, ποσότητα αρκετή για να ανιχνεύεται εύκολα μία συγκεκριμένη μοναδιαία αλληλουχία DNA, ξεκινώντας από το 1% ή λιγότερο της ποσότητας γονιδιακού DNA που απαιτείται για να γίνει ένα συνηθισμένο πείραμα με στύπωμα κατά Southern.

Ο ταχύς πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων αλληλουχιών μπορεί επίσης να διευκολύνει την κλωνοποίηση γονιδίων από δείγματα DNA, για την ανάλυση μεταλλάξεων (PCR-SSCP) και πολυμορφισμών (PCR-RFLP). Αυτό που άλλοτε αποτελούσε μία εξαιρετικά επίπονη διαδικασία απαιτώντας την κατασκευή μίας βιβλιοθήκης γονιδιακού DNA ή cDNA από το RNA ή το DNA του ασθενούς και κατόπιν έλεγχο διαλογής του επιθυμητού γονιδίου, τώρα μπορεί να διεξαχθεί σε λιγότερο από μία ημέρα (εικόνα 2.3).

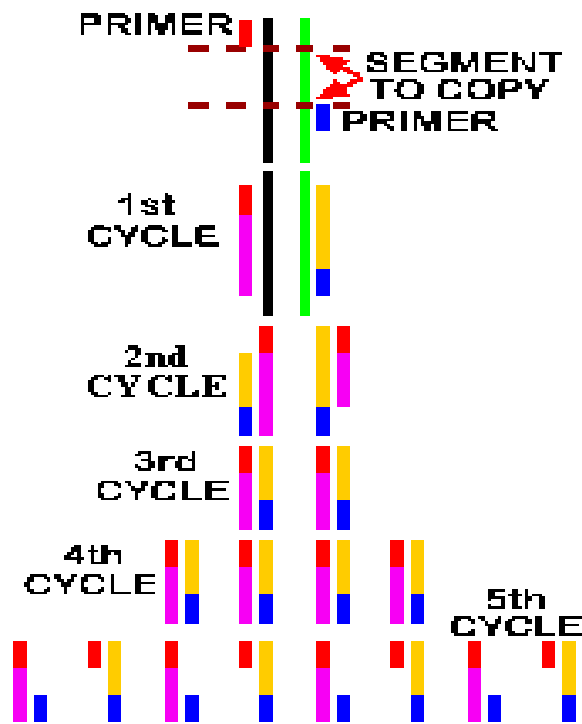
### Inside the PCR reaction tube...



**Εικόνα 2.3.** Σχηματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ([www.pitt.edu](http://www.pitt.edu))

Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. Στατιστικά έχει βρεθεί ότι όταν μια αλληλουχία DNA έχει μέγεθος τουλάχιστον 20 bp, είναι μοναδική στο γονιδίωμα. Κατά συνέπεια για να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση αλληλουχιών πρέπει οι εκκινητές να είναι τουλάχιστον 20 βάσεων. Το μέσο αυτό μήκος των εκκινητών τους δίνει τέτοια θερμοδυναμική σταθερότητα ώστε να αναδιατάσσονται στη θερμοκρασία των 55°C περίπου.

Η επίτευξη ικανοποιητικής απόδοσης και ειδικότητας της αντίδρασης πολυμερισμού εξαρτάται κυρίως από την επιλογή κατάλληλου ζεύγους εκκινητών, από τη συγκέντρωση των ιόντων Mg (απαραίτητος συν-παράγοντας για τη δράση της πολυμεράσης) και από τον προσδιορισμό ακριβούς θερμοκρασίας αναδιάταξης των εκκινητών (Newton and Graham, 1997). Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών, η κανονικοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης περιλαμβάνει πειράματα με βαθμωτές τιμές θερμοκρασίας και ιόντων μαγνησίου, ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό.



**Εικόνα 2.4.** Πολλαπλασιασμός ενός DNA αντιγράφου κατά τη διάρκεια των διαφόρων κύκλων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απαραίτητη προϋπόθεση είναι να τερματιστεί η αντίδραση ενώ ακόμα βρίσκεται στην εκθετική της φάση. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας προϊόντος στην αρχική ποσότητα υποστρώματος. Συνήθως επιτελούνται προκαταρκτικά πειράματα με διαδοχικές αραιώσεις αρχικού υποστρώματος (δημιουργία πρότυπης καμπύλης), ώστε να βρεθούν οι συνθήκες εκείνες όπου διατηρείται η γραμμική σχέση.

Ακόμα περισσότερο αξιόπιστη είναι η συνενίσχυση με την αλληλουχία στόχο, σταθερής ποσότητας υποστρώματος, στο οποίο οι θέσεις αναγνώρισης των εκκινητών ταυτίζονται με αυτή της αλληλουχίας-στόχου (Siebert and Larrick, 1992). Έτσι επιτελείται συναγωνισμός ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες που συνενισχύονται. Η αφθονία των αρχικών αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται ως ο λόγος της έντασης της ζώνης της ως προς την ένταση της ζώνης του συναγωνιστή (εικόνα 2.4).

Συγκεκριμένα, το πρόγραμμα της PCR που σχεδιάστηκε για την ενίσχυση της περιοχής όπου ευρίσκεται ο πολυμορφισμός που μελετάμε παρουσιάζεται στον πίνακα (2.2) που ακολουθεί.

**Πίνακας 2.2.** Συνθήκες για το exon 12 του CYP5A1.

Step	Temperature	Time	Procedure
------	-------------	------	-----------

1	94°C	2min	Initial incubation
5	Repeat from step 2 to step 4 for 34 times		
6	72°C	5min	Final extension
7	4°C	forever	Cooling

Τα αντιδραστήρια, οι συγκεντρώσεις τους αλλά και οι ποσότητες τους που χρησιμοποιήθηκαν για μία PCR αντίδραση φαίνονται παρακάτω (πίνακας 2.3).

**Πίνακας 2.3.** Συγκεντώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

PCR reagent	Volume
-------------	--------

ddH<sub>2</sub>O

17,28μl

Η ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων ενός γενετικού τόπου αναφέρεται ως γενετικός πολυμορφισμός. Κάθε τόπος για τον οποίο υπάρχουν πολλαπλά αλληλόμορφα σε σταθερές συχνότητες μέσα στον πληθυσμό είναι εξ ορισμού πολυμορφικός. Συνήθως ένα αλληλόμορφο θεωρείται πολυμορφικό εάν απαντάται στον πληθυσμό σε συχνότητα >1%. Όταν τα αλληλόμορφα διαφέρουν μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο, το φαινόμενο καλείται **πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP, single nucleotide polymorphism)**. Η συχνότητα τέτοιων αλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι περίπου μία ανά ~1.330 βάσεις. Οι πολυμορφισμοί SNP μπορεί να προσδιοριστούν με διάφορους τρόπους, όπως με απευθείας σύγκριση αλληλουχιών, με φασματοσκοπία μάζας ή βιοχημικές μεθόδους που ανιχνεύουν διαφορές σε πολυμορφικές θέσεις εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής.

**H allele-specific PCR (AS PCR)** είναι ένας απλός τρόπος για να βρεθούν SNPs (small nucleotide polymorphisms) σε DNA δείγματα ατόμων. Η μέθοδος είναι ιδανική για την ανάλυση του γενωμικού DNA από μικρά δείγματα ιστού, αίματος ή άλλων οργανικών πηγών και δεν απαιτεί ξεχωριστά βήματα για την ενίσχυση του διαγνωστικού στόχου ή την ανίχνευση του παραγόμενου σήματος.

Όταν εφαρμόζεται ανίχνευση SNPs, η τεχνική AS PCR απαιτεί την χρήση δυο allele-specific primers και ενός κοινού primer (i.e. reverse primer). Οι allele-specific primers έχουν 3' βάσεις, που είναι συμπληρωματικές στον ένα από τους δύο SNP πολυμορφισμούς που βρίσκονται στο δείγμα DNA. Ο ένας allele-specific primer θα ταιριάζει τέλεια στο ένα αλληλόμορφο ενώ θα υπάρχει και ένα 3' mismatch στο εναλλασσόμενο αλληλόμορφο. Ο primer που είναι παράταιρος δεν θα είναι αποτελεσματικά ενισχυμένος σε μία αντίδραση PCR και δεν θα παραχθεί προϊόν (amplicon). Ένα τέτοιο αποτέλεσμα δείχνει στον ερευνητή ποιο αλληλόμορφο SNP είναι παρόν στο δείγμα DNA. Εντούτοις, σε ορισμένα πλαίσια αλληλουχίας, ένας mismatched

DNA allele-specific primer μπορεί να ενισχυθεί λανθασμένα, προκαλώντας προβλήματα στην εφαρμογή αυτής της κατά τα άλλα ελκυστικής τεχνικής.

Στην ερευνά μας, σχεδιάστηκαν νέοι primers με βάση την μεθοδολογία των allele specific, για το exon 12 του γονιδίου *CYP5A1*, που εντοπίζουν τον πολυμορφισμό *CYP5A1\*9* όπου γίνεται η αντικατάσταση 1397 G>A (R466Q) (πίνακας 2.4). Οι εκκινητές επιλέχθηκαν από εμάς και ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα “BLAST” της ιστοσελίδας “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>” με επιλογή του συνδέσμου “nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)”.

Πίνακας 2.4.

**AS primers για το exon 12**

5´ GGGGCTGTGCAGGAAGACAGGAGG (common forward)

5´ CCGAAGGGCAGGTACGTGAAGGGCC (normal reverse)

5´ CCGAAGGGCAGGTACGTGAAGGGCT (mutant reverse)



### **2.2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA. Επίσης, εκτός από την ποσοτικοποίηση δίνει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα του DNA και την περιεκτικότητά του σε RNA.

Το πλέγμα της αγαρόζης κατά την ηλεκτροφόρηση επιτρέπει στα κομμάτια DNA να διανύσουν συγκεκριμένες αποστάσεις ανάλογα με το Μοριακό Βάρος τους, τη διαμόρφωσή τους και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Για παράδειγμα, τα μικρότερα μοριακού βάρους κομμάτια DNA κινούνται γρηγορότερα και διανύουν μεγαλύτερη απόσταση μέσα στο πήκτωμα από ότι τα μεγαλύτερα κομμάτια του DNA.

Για να είναι τα αποτελέσματα ευδιάκριτα, απαιτείται η χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) το οποίο παρεμβαίνει ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA και όταν το πήκτωμα εκτεθεί σε υπεριώδες φως (μήκους κύματος 250-300nm), το σύμπλοκο EtBr-DNA φθορίζει. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται στο πήκτωμα αγαρόζης σε τελική συγκέντρωση 0,5ng/ml.

Ο ηλεκτροφορητικός ρυθμός κίνησης του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους όπως:

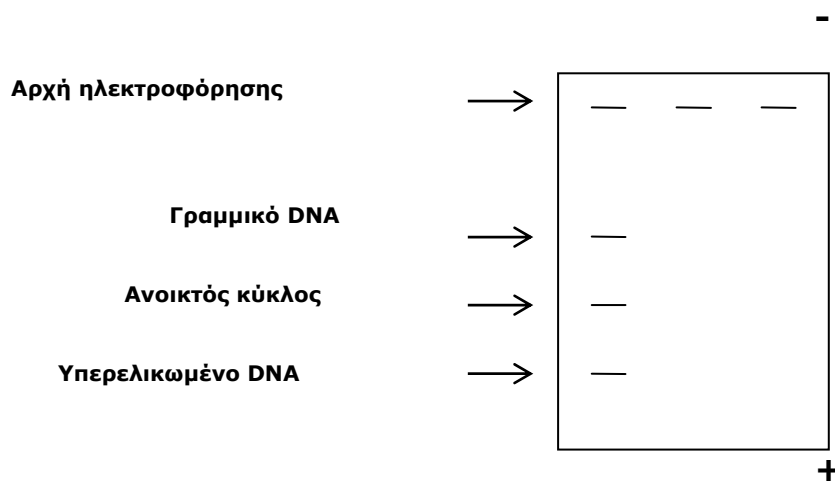
- Το Μοριακό Βάρος του DNA: «Τα γραμμικά μόρια κινούνται αντιστρόφως ανάλογα με το log των μοριακών βαρών τους».
- Τη συγκέντρωση της αγαρόζης: «Υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση του λογάριθμου της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του DNA ( $\mu$ ) και της συγκέντρωσης του πηκτώματος ( $\tau$ )».

$$\log \mu = \log \mu_0 - K r \tau$$

όπου  $\mu_0$  = η ελεύθερη ηλεκτροφορητική ικανότητα και  $Kr$  = μια σταθερά που σχετίζεται με τις ιδιότητες του πηκτώματος και το μέγεθος και τη διαμόρφωση των τμημάτων του DNA.

- Τη διαμόρφωση του DNA: το υπερελικωμένο DNA, το κυκλικό με εγκοπή (nicked) DNA και το γραμμικό DNA κινούνται διαφορετικά σε ένα πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 2.5.)

**Εικόνα 2.5.**



Το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης είναι το TBE, το οποίο προσδίδει αγωγιμότητα στο πήκτωμα με τα ιόντα του βορικού οξέος. Αυτό φτιάχνεται 10 φορές συγκεντρωμένο (10x) και αραιώνεται στο 1x για την ηλεκτροφόρηση. Στο δείγμα του DNA, πριν φορτωθεί στο πήκτωμα, πρέπει να προστεθεί το διάλυμα loading buffer ή loading dye: Blue/Orange 6x σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού προστεθεί το loading buffer στο δείγμα, φορτώνεται στο gel. Η αγαρόζη (2gr για 2% gel) διαλύεται σε 0,5x TBE (100ml) με βρασμό και μετά την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (~5μl), αφήνεται να στερεοποιηθεί σε ειδική μήτρα στην οποία τοποθετείται κατάλληλο χτένι για το σχηματισμό των θέσεων όπου φορτώνονται τα δείγματα.

Πάντα χρησιμοποιείται ένας μάρτυρας γνωστού Μοριακού Βάρους (ladder) για να προσδιοριστούν τα Μοριακά Βάρη του δείγματός μας. Ο προσδιορισμός των Μοριακών Βαρών του δείγματος γίνεται με τη βοήθεια μιας ημιλογαριθμικής καμπύλης με βάση το μάρτυρα που χρησιμοποιούμε. Οι συντεταγμένες είναι για τον άξονα Χ τα μοριακά βάρη του μάρτυρα και για τον άξονα Υ η απόσταση που έχουν διανύσει τα δείγματα από το αρχικό σημείο της ηλεκτροφόρησης μέσα στο πήκτωμα. Η πήξη της αгарόζης γίνεται με πτώση της θερμοκρασίας, αφού πρώτα έχει βράσει. Αφού φορτωθούν τα δείγματα στα πηγαδάκια, η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 150 Volts για 20-30 λεπτά.

Loading buffer (Διάλυμα φόρτωσης στην ηλεκτροφόρηση): Πριν την ηλεκτροφόρηση του δείγματος αυτό αναμειγνύεται με τις χρωστικές, κυανό της βρωμοφαινόλης (0.25%), κυανό του ξυλενίου (0.25%) και με γλυκερόλη (15%).

TBE (10x): 0.9M Tris-Base, 0.9M Βορικό οξύ, 25mM EDTA, pH 8.3, 4°C

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): 10 mg/ml H<sub>2</sub>O, 4°C

Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα στάλθηκαν αντιπροσωπευτικά δείγματα (ομόζυγα και ετερόζυγα για όλους τους γονοτύπους) για sequencing για να αποκλείσουμε περίπτωση να έχουμε μη-ειδική (non-specific) υβριδοποίηση των primers. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε αυτοματοποιημένο σύστημα για sequencing, το ABI 377 (PE Applied Biosystems, Warrington, UK). Αποδείχθηκε ότι τα AS-PCR products που πήραμε ήταν αυτά που έπρεπε βάση των primers που σχεδιάστηκαν.

#### **2.2.4. Υλικά και εταιρείες προέλευσης**

Αγαρόζη-Gibco BRL	SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)-BDH
Αιθανόλη-BDH	Taq πολυμεράση-Invitrogen, Promega
Ανθρακικό νάτριο-Sigma	TEMED-Sigma
Βορικό οξύ-BDH	Tris base-BDH
Βρωμιούχο αιθίδιο-Sigma	Triton-X-100-Sigma
Γλυκερόλη-Gibco BRL	Tween-20-Sigma
Δεσοξυριβινουκλεοτίδια-Gibco BRL	NaOH-Sigma

Ισοπροπανόλη-BDH	HCl-BDH
Κυανό της βρωμοφαινόλης-Sigma	Φαινόλη-BDH
Μεθανόλη-BDH	KCl-Sigma
Οξείκό οξύ-BDH	MgCl <sub>2</sub> -Sigma
	NaCl-Sigma
	CHCl <sub>3</sub> -BDH

### 2.3. Στατιστική ανάλυση

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες στατιστικές δοκιμασίες. Η κατανομή των αλληλομόρφων αντιπαραβλήθηκε ως προς τα στοιχεία από το ιστορικό ασθενών και μαρτύρων και από τα δεδομένα γύρω από τη θεραπεία και την έκβαση των ασθενών, ώστε να αναδειχθούν ενδεχόμενες συσχετίσεις γενετικής προδιάθεσης με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της νόσου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS for Windows (έκδοση 12.0.1), καθώς και του προγράμματος Microsoft Office Excel 2003 σε Η/Υ. Η εκτίμηση των γονότυπων βασισμένων σε ατομικές συχνότητες αλληλομόρφων έγινε με βάση τη θεωρία της ισορροπίας των γονιδίων σε ένα πληθυσμού Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium). Το μοντέλο αυτό δηλώνει ότι υπάρχει προβλεπόμενη σχέση μεταξύ συχνότητας αλληλομόρφων και συχνότητας γονότυπου σε μια θέση χρωμοσώματος. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμές Mann Whitney U test, Chi-square test ( $\chi^2$ ), Kruskal-Wallis H test και Kolmogorov-Smirnov test για την ανάλυση των συχνοτήτων, των φαινοτύπων, των κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το τελικό αποτέλεσμα των πολυμορφισμών του γονιδίου *CYP5A1* στην ενζυμική δραστικότητα του αντίστοιχου γονιδιακού προϊόντος παραμένει εν πολλοίς άγνωστο. Έτσι, δεν υπάρχουν δεδομένα γύρω από την επίπτωση των ΑΕΕ ή τη δράση της ασπιρίνης σε φορείς πολυμορφισμών του *CYP5A1*. Δεν είναι, επίσης, γνωστές η συχνότητα και η φύση των πολυμορφικών αλληλομόρφων του γονιδίου στους Έλληνες. Από τα παραπάνω διαφαίνεται η σημασία της μελέτης που έγινε. Συγκεκριμένα, μέσω αυτής έγινε προσπάθεια να δοθούν απαντήσεις στα εξής ερωτήματα:

- Ποια είναι η συχνότητα και η φύση των πολυμορφικών αλληλομόρφων του γονιδίου *CYP5A1* στον ελληνικό πληθυσμό και εάν αυτές διαφέρουν στις επιμέρους γεωγραφικές περιοχές;
- Απαντώνται εκλεκτικά πολυμορφισμοί του *CYP5A1* σε ασθενείς με ΑΕΕ, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό;
- Εάν ναι, συσχετίζονται συγκεκριμένα αλληλόμορφα του *CYP5A1* με κάποια κλινικά ή εργαστηριακά δεδομένα με την έκβαση των ασθενών ή με την πιθανότητα να ξανασυμβεί ΑΕΕ;
- Προσφέρει η ύπαρξη του μη μεταλλαγμένου (wild-type) τύπου πλεονέκτημα ή μειονέκτημα στην ασπιρίνη σε ότι αφορά την πρωτογενή ή δευτερογενή πρόληψη ΑΕΕ;

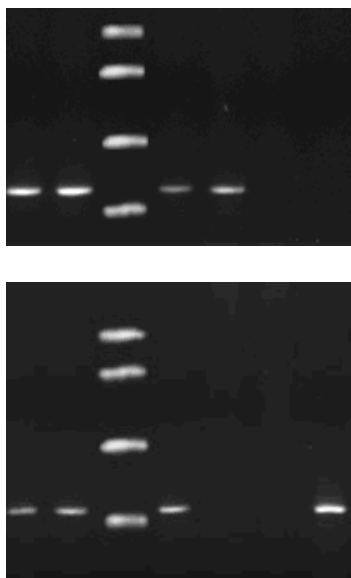
Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από το wild-type αλληλίο *CYP5A1\*1* του εξωνίου 12 και το mutant αλληλίο *CYP5A1\*9*, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης φαίνονται στην εικόνα 3.1.

**Εικόνα 3.1.** Απεικόνιση του πήκτωματος μετά από φωτογράφιση με UV της ηλεκτροφόρησης των allele-specific PCR προϊόντων.

1:\*1/\*9, 2:\*1/\*9, marker: 100 bp DNA ladder, 3:\*1/\*9, 4:\*1/\*1, ---negative control, 5:\*9/\*9

Στην πάνω πλευρά του πήκτωματος βλέπουμε τα προϊόντα της PCR που έγινε με το μείγμα των εκκινητών που ανιχνεύουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενώ στην κάτω πλευρά βλέπουμε τα προϊόντα της PCR που έγινε με το μείγμα των εκκινητών που ανιχνεύουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Η διεξαγωγή των συμπερασμάτων για το είδος του γονότυπου του κάθε δείγματος γίνεται με βάση την ένταση των ζωνών που παρατηρούνται. Το προϊόν ανιχνεύεται στο ύψος των **241bp**

**1 2 marker 3 4 --- 5**



Οι φορείς ενός *mutant- CYP5A1\*9* αλληλόμορφου (ομόζυγοι και ετερόζυγοι) αποτέλεσαν μία ομάδα στην παρούσα μελέτη και θεωρήθηκαν ως ασθενείς ή υγιείς μάρτυρες που έφεραν την μετάλλαξη. Συνολικά εξετάστηκαν 408 άτομα, 237 ασθενείς και 171 υγιείς μάρτυρες. Η συχνότητα του wild-type *CYP5A1\*1* αλληλόμορφου του εξωνίου 12 και του mutant *CYP5A1\*9* ανάμεσα στον εξεταζόμενο πληθυσμό ήταν 80,3% (327) και 19,7% (81) αντίστοιχα για το σύνολο ασθενών και μαρτύρων.

Αυτή η συχνότητα δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ (ΤΙΑ) και τους υγιείς μάρτυρες. Στους 237 ασθενείς η συχνότητα για το *CYP5A1\*1* και το *CYP5A1\*9* ήταν 81,2% (192) και 18,8% (45) και στους 171 υγιείς μάρτυρες 79,2% (135) και 20,8% (36), αντίστοιχα (πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1.** Οι συχνότητες των αλληλόμορφων του εξωνίου 12 του γονιδίου *CYP5A1* στον υπό μελέτη πληθυσμό, για ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Αλληλόμορφων σε ασθενείς+μάρτυρες (n=408)	% συχνότητα των δύο αλληλόμορφων σε ασθενείς με ΑΕΕ (n=237)	% συχνότητα

Ήταν αξιοσημείωτη η συχνότητα του mutant αλληλόμορφου *CYP5A1\*9* μεταξύ των ασθενών της Κρήτης. Η συχνότητα του ήταν πολύ χαμηλότερη σε σχέση με την συχνότητά του στους ασθενείς από την Ηπειρωτική Ελλάδα (*OR for the wild-type: 1.81, 95% CI 1.04-3.14; p=0.036*). Εξετάσθηκαν συνολικά 110 άτομα από τη Κρήτη, ασθενείς και μάρτυρες. Η συχνότητα του wild-type *CYP5A1\*1* αλληλόμορφου και του mutant *CYP5A1\*9* ήταν 85,5% (94) για τους ασθενείς και 14,5% (16) για τους μάρτυρες. Από την Ηπειρωτική Ελλάδα συνολικά εξετάσθηκαν 298 άτομα, ασθενείς και μάρτυρες. Η συχνότητα του wild-type *CYP5A1\*1* αλληλόμορφου και του mutant *CYP5A1\*9* σε αυτή την ομάδα της μελέτης μας ήταν 76,5% (227) για τους ασθενείς και 23,5% (71) για τους μάρτυρες. (*Odds Ratio for the wild-type: 1.80, 95%, confidence intervals 1.19-2.74; p=0.005*).

Το ίδιο παρατηρήθηκε ακόμη και όταν οι ασθενείς με ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ(ΤΙΑ) αναλύθηκαν σαν ξεχωριστή ομάδα. Αναλυτικότερα εξετάσθηκαν 64 ασθενείς από την Κρήτη. Σε αυτή την ομάδα μόνο των ασθενών από την Κρήτη η συχνότητα για το αλληλόμορφο *CYP5A1\*1* και το αλληλόμορφο *CYP5A1\*9* ήταν 85,9% (54) και 14,1% (10) αντίστοιχα. Από την Ηπειρωτική Ελλάδα εξετάσθηκαν 173 ασθενείς και η συχνότητα για τα δύο αλληλόμορφα ήταν 77,2% (133) για το *CYP5A1\*1* και 22,8% (40) για το *CYP5A1\*9*. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον πίνακα 3.2.

**Πίνακας 3.2.** Οι συχνότητες των αλληλόμορφων του εξωνίου 12 του γονιδίου *CYP5A1* στον υπό μελέτη πληθυσμό για Κρήτη και Ηπειρωτική Ελλάδα.

Αλληλόμορφα	% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς+μάρτυρες από Κρήτη (n=110)	% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς+μάρτυρες από Ηπειρωτική Ελλάδα (n=298)	% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς με ΑΕΕ από Κρήτη (n=64)	% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς με ΑΕΕ από Ηπειρωτική Ελλάδα (n=173)

<b>CYP5A1*1</b>	85,5 (94)	76,5 (227)	85,9 (54)	77,2 (133)
<b>CYP5A1*9</b>	14,5 (16)	23,5 (71)	14,1 (10)	22,8 (40)

Για να επισημανθεί αυτή η σημαντική διαφορά στη συχνότητα των αλληλόμορφων ανάμεσα στον πληθυσμό από την Ηπειρωτική Ελλάδα και την Κρήτη τα Odds Ratio για την παραπέρα ανάλυση δεδομένων διορθώθηκαν βάση την περιοχή καταγωγής για τους ασθενείς με ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ.

Σε σχέση με τους παράγοντες κινδύνου (υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, διαβήτης, κάπνισμα), καταγράφηκαν οι παρακάτω συσχετισμοί:

Ανάμεσα στους ασθενείς με ΑΕΕ, η παρουσία του wild-type *CYP5A1\*1* αλληλόμορφου ήταν πιο συχνή στους υπερτασικούς (*OR* 1.68, 95% *CI* 1.01-2.79; *p*=0.045), και λιγότερο στους διαβητικούς (*OR* 0.55, 95% *CI* 0.36-0.84; *p*=0.006). Αναλυτικότερα, στα 408 άτομα που εξετάστηκαν (ασθενείς και μάρτυρες), 326 υπέφεραν από υπέρταση και 82 όχι. Στα 326 άτομα (ασθενείς και μάρτυρες), που υπέφεραν από υπέρταση η συχνότητα του *CYP5A1\*1* ήταν 77,3% (251) και του *CYP5A1\*9* ήταν 22,7% (75). Στα 82 εξεταζόμενα άτομα (ασθενείς και μάρτυρες), που δεν υπέφεραν από υπέρταση τα ποσοστά για τα δύο αλληλόμορφα ήταν 70,7% (57) για το wild-type και 29,3% (25) για το mutant, αντιστοίχως, ποσοστά μη στατιστικά σημαντικά. Στην ομάδα των ασθενών με ΑΕΕ ή ΤΙΑ συνολικά μελετήθηκαν 237 άτομα. Από αυτά 193 με ιστορικό υπέρτασης και 44 χωρίς. Στα 193 άτομα με ΑΕΕ και ιστορικό υπέρτασης η συχνότητα των δύο αλληλόμορφων ήταν 78,2% (150) και 21,8% (43) για το wild-type και mutant



αντίστοιχα. Στα 44 άτομα με ιστορικό ΑΕΕ αλλά ελεύθερο ιστορικό υπέρτασης η συχνότητα τους ήταν 68,2% (30) και 31,8% (14) αντιστοίχως, (πίνακας 3.3).

**Πίνακας 3.3.** Οι συχνότητες των αλληλόμορφων του εξωνίου 12 του γονιδίου *CYP5A1* στον υπό μελέτη πληθυσμό για υπέρτατικούς.

Αλληλόμορφα	ασθενείς+μάρτυρες		ασθενείς με ΑΕΕ	
	% Συχνότητα αλληλόμορφων με υπέρταση (n=326)	% Συχνότητα αλληλόμορφων χωρίς υπέρταση (n=82)	% Συχνότητα αλληλόμορφων με υπέρταση (n=193)	% Συχνότητα αλληλόμορφων χωρίς υπέρταση (n=44)
<b><i>CYP5A1</i>*1</b>	77,3 (251)	70,7 (57)	78,2 (150)	68,2 (30)
<b><i>CYP5A1</i>*9</b>	22,7 (75)	29,3 (25)	21,8 (43)	31,8 (14)

Από τα 408 άτομα που μελετήθηκαν συνολικά (ασθενείς και μάρτυρες), τα 148 είχαν ιστορικό με διαβήτη, ενώ τα 260 όχι. Στους 237 ασθενείς με ιστορικό ΑΕΕ 92 υπέφεραν από διαβήτη ενώ 145 όχι. Στο σύνολο των 148 ασθενών και μαρτύρων με ιστορικό διαβήτη η συχνότητα των δύο αλληλόμορφων ήταν 74% (109) για το *CYP5A1\*1* αλληλόμορφο και 26% (39) για το *CYP5A1\*9*. Για τους 260 ασθενείς και μάρτυρες με ελεύθερο ιστορικό από διαβήτη ήταν 76,9% (199) για το *CYP5A1\*1* αλληλόμορφο και 23,1% (61) για το *CYP5A1\*9*, αποτελέσματα δηλαδή για τις δύο ομάδες, χωρίς ιδιαίτερης στατιστικής σημασίας.

Μελετήσαμε χωριστά και την ομάδα των ασθενών με ΑΕΕ με ιστορικό διαβήτη ή όχι. Συνολικά 237 ασθενείς, 92 με διαβήτη και 145 χωρίς. Οι 92 ασθενείς με ΑΕΕ και διαβήτη παρουσίαζαν συχνότητα των δύο αλληλομόρφων *CYP5A1\*1* και *CYP5A1\*9*, 70,1% (64) και 29,9% (28) αντίστοιχα, ενώ στους 145 με ΑΕΕ και χωρίς ιστορικό διαβήτη η συχνότητά τους ήταν 81% (117) και 19% (28) αντίστοιχα, (πίνακας 3.4). Δηλαδή η παρουσία του *CYP5A1* wild type για τους ασθενείς με ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ/ΤΙΑ παρουσιάζεται με μικρότερη συχνότητα στους διαβητικούς σε σχέση με τους υπερτασικούς, με OR 0.55 και OR 1.68 αντίστοιχα, (πίνακας 3.5).

**Πίνακας 3.4.** Οι συχνότητες των αλληλόμορφων του εξωνίου 12 του γονιδίου *CYP5A1* στον υπό μελέτη πληθυσμό για διαβητικούς.

	ασθενείς+μάρτυρες		ασθενείς με ΑΕΕ	
<b>Αλληλόμορφα</b>	<b>% Συχνότητα αλληλόμορφων με διαβήτη (n=148)</b>	<b>% Συχνότητα αλληλόμορφων χωρίς διαβήτη (n=260)</b>	<b>% Συχνότητα αλληλόμορφων με διαβήτη (n=92)</b>	<b>% Συχνότητα αλληλόμορφων χωρίς διαβήτη (n=145)</b>

<b>CYP5A1*1</b>	74,0 (109)	76,9 (199)	70,1 (64)	81,0 (117)
-----------------	------------	------------	-----------	------------

**Πίνακας 3.5.** Οι συχνότητες των αλληλόμορφων του εξωνίου 12 του γονιδίου CYP5A1 στους ασθενείς με ΑΕΕ, συγκριτικά ανάμεσα σε διαβητικούς και υπέρτασικούς.

	<b>(%) Συχνότητα των δύο αλληλόμορφων</b>	
<b>ασθενείς με ΑΕΕ (n=237)</b>	<b>CYP5A1*1</b>	<b>CYP5A1*9</b>
<b>ασθενείς με ΑΕΕ + υπέρταση (n=193)</b>	78,2 (150)	21,8 (43)

Στον υπό μελέτη πληθυσμό δεν είχαμε στατιστικά σημαντικά δεδομένα για το κάπνισμα και τη δισλιπιδαιμία, σημαντικούς παράγοντες κινδύνου στην παθογένεση της νόσου. Εξετάσθηκαν 73 ασθενείς με ΑΕΕ που κάπνιζαν. Η συχνότητα για τα δύο αλληλόμορφα ήταν 82,2% (60) και 17,8% (13), για το *CYP5A1\*1* και το *CYP5A1\*9* αντίστοιχα. Επίσης εξετάσθηκαν 164 ασθενείς που δεν κάπνιζαν με συχνότητα 75% (123) για το *CYP5A1\*1* αλληλόμορφο και 25% (41) για το *CYP5A1\*9*, όχι στατιστικά σημαντικό. Σε σχέση με τον προδιαθεσικό παράγοντα δυσλιπιδαιμία μελετήθηκαν 83 ασθενείς με ΑΕΕ που είχαν τέτοιο πρόβλημα. Η συχνότητα για τα δύο αλλήλια, το wild-type και το mutant ήταν 73,2% (60) και 26,8% (23). Ομοίως μελετήθηκαν 154 ασθενείς με ΑΕΕ χωρίς τον επιβαρυντικό παράγοντα δυσλιπιδαιμία. Η συχνότητα ήταν 78,9% (121) και 21,1% (33) αντίστοιχα για τα δύο αλληλόμορφα, χωρίς πάλι σημαντικά στατιστικά δεδομένα (πίνακας 3.6).

**Πίνακας 3.6.** Οι συχνότητες των αλληλόμορφων του εξωνίου 12 του γονιδίου *CYP5A1* στους ασθενείς με ΑΕΕ σε σχέση με τον παράγοντα κάπνισμα και δυσλιπιδαιμία.

ασθενείς με ΑΕΕ (n=237)				
Αλληλόμορφα	% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς με ΑΕΕ και κάπνισμα (n=73)	% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς με ΑΕΕ χωρίς κάπνισμα (n=164)	% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς με ΑΕΕ και δυσλιπιδαιμία (n=83)	% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς με ΑΕΕ χωρίς δυσλιπιδαιμία (n=154)

<b>CYP5A1*1</b>	82,2 (60)	75,0 (123)	73,2 (60)	78,9 (121)
<b>CYP5A1*9</b>	17,8 (13)	25,0 (41)	26,8 (23)	21,1 (33)

Ανάμεσα στους ασθενείς με ΑΕΕ, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *CYP5A1\*9* ήταν στατιστικά σημαντικά περισσότερο επικρατές σε αυτούς με επαναλαμβανόμενα ΑΕΕ ενώ έπαιρναν ασπιρίνη, συγκριτικά με αυτούς με επιτυχημένη δευτερογενή προφυλακτική θεραπεία με ασπιρίνη (*OR 1.73, 95% CI 1.10-2.73 p=0.017*). Μετά από προσαρμογή της δόσης της ασπιρίνης και μεταβάλλοντας τους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο (ηλικία, φύλο, κάπνισμα, διαβήτη, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία), η αυξημένη έκφραση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου *CYP5A1\*9* σε αυτούς με επαναλαμβανόμενα ΑΕΕ παρέμενε στατιστικά αξιοσημείωτη (*OR 1.49, 95% CI 1.06-2.11 p=0.038*). Αναλυτικότερα στους 237 ασθενείς που μελετήθηκαν, οι 71 έκαναν χρήση ασπιρίνης χωρίς επιτυχία και οι 166 με επιτυχία. Για τους 71 ασθενείς, η συχνότητα των δύο αλληλόμορφων ήταν 71,1% (50) για το *CYP5A1\*1* αλληλόμορφο και 28,9% (21) για το *CYP5A1\*9* αλληλόμορφο. Για τους 166 ήταν 81% (134) και 19% (32) αντίστοιχα για τα δύο αλληλόμορφα (πίνακας 3.7).

**Πίνακας 3.7.** Οι συχνότητες των αλληλόμορφων του εξωνίου 12 του γονιδίου *CYP5A1* στους ασθενείς με ΑΕΕ σε σχέση με την προφυλακτική χρήση της ασπιρίνης.

	<b>ασθενείς με ΑΕΕ (n=237)</b>
--	--------------------------------

<b>Αλληλόμορφα</b>	<b>% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς με νέο ΑΕΕ υπό λήψη ασπιρίνης (n=71)</b>	<b>% Συχνότητα αλληλόμορφων σε ασθενείς χωρίς νέο ΑΕΕ υπό λήψη ασπιρίνης (n=166)</b>
<b><i>CYP5A1*1</i></b>	71,1 (50)	81,0 (134)
<b><i>CYP5A1*9</i></b>	28,9 (21)	19,0 (32)

Μελετήθηκαν επίσης οι συχνότητες των δύο αλληλόμορφων του *CYP5A1\*1* και του *CYP5A1\*9*, διορθωμένες ως προς τους παράγοντες κινδύνου σε τρεις κατηγορίες ατόμων βάσει του ιστορικού τους σε σχέση με προηγούμενα επεισόδια ΑΕΕ: 108 άτομα με ΑΕΕ που τους συνέβαινε για πρώτη φορά, 77 άτομα με μόνο ένα προηγούμενο ΑΕΕ, και 52 άτομα με ιστορικό πολλαπλών ΑΕΕ. Η συχνότητα για το mutant αλληλόμορφο ήταν 19,9% (22), 27,2% (21), και 28% (15) αντίστοιχα, ενώ η συχνότητα για το wild-type αλληλόμορφο στις τρεις αυτές κατηγορίες ήταν 80,1% (86), 72,8% (56), 72% (37) αντίστοιχα. Το p-value ήταν <0.01, στατιστικά σημαντικό (πίνακας 3.8).

**Πίνακας 3.8.** Οι συχνότητες των αλληλόμορφων του εξωνίου 12 του γονιδίου *CYP5A1* στους ασθενείς με ΑΕΕ και προηγούμενο σχετικό ιστορικό.

<b>προηγούμενο ιστορικό με ΑΕΕ</b>	<b>συνολικά 237 ασθενείς με ΑΕΕ</b>	<b>% Συχνότητα <i>CYP5A1*9</i></b>

		<b>% Συχνότητα CYP5A1*1</b>	
<b>ελεύθερο ιστορικό</b>	<b>108 ασθενείς</b>	80,1 (86)	19,9 (22)
<b>ένα επεισόδιο</b>	<b>77 ασθενείς</b>	72,8 (56)	27,2 (21)
<b>πολλά επεισόδια</b>	<b>52 ασθενείς</b>	72,0 (37)	28,0 (15)

Αναφορικά με τους τύπους ΑΕΕ, το μεταλλαγμένο *CYP5A1\*9* ήταν επικρατέστερο σε ασθενείς με νόσο μικρών αγγείων σε σχέση με αυτούς με νόσο μεγάλων αγγείων και ΤΙΑ, αλλά χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Από τους 237 ασθενείς οι 28 ήταν με ΤΙΑ, οι 94 με νόσο μεγάλων αγγείων, οι 82 με νόσο μικρών και 33 με αγγειακό εγκεφαλικό αγνώστου αιτιολογίας. Η συχνότητα των δύο αλληλόμορφων του *CYP5A1\*1* και *CYP5A1\*9* φαίνεται στο πίνακα 3.9.

**Πίνακας 3.9.** Συσχέτιση των αλληλόμορφων με το είδος του εγκεφαλικού

<b>Τύπος ΑΕΕ</b>	<b>Ασθενείς με ΑΕΕ (n=237)</b>	<b><i>CYP5A1*1</i> (%)</b>	<b><i>CYP5A1*9</i> (%)</b>
<b>ΤΙΑ<sup>1</sup></b>	<b>n=28</b>	71,4 (19)	28,6 (9)



<b>LVD<sup>2</sup></b>	<b>n=94</b>	78,2 (73)	21,8 (21)
<b>SVD<sup>3</sup></b>	<b>n=82</b>	69 (56)	31 (26)
<b>IU<sup>4</sup></b>	<b>n=33</b>	81,8 (26)	18,2 (7)

1 Παροδικό ΑΕΕ, 2 νόσο μεγάλων αγγείων, 3 νόσο μικρών αγγείων, 4 αγκειακό εγκεφαλικό αγνώστου αιτιολογίας.

Τα γονοτυπικά αποτελέσματα έγινε προσπάθεια να συσχετιστούν και με άλλους κλινικούς παράγοντες που ήταν γνωστοί για τους ασθενείς ή και τους υγιείς μάρτυρες. Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση με την ηλικία, το φύλο και άλλους προδιαθεσικούς παραγόντες για αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια όπως το οικογενειακό ιστορικό, η παχυσαρκία, οι τιμές της CRP, κ.λ.π. εκτός από αυτές που ήδη αναφέρθηκαν. Η συσχέτιση των διαφορετικών γονοτύπων των ατόμων με το φύλο τους δεν έδειξε κάποιο ιδιαίτερο ενδιαφέρον, μιας και η συχνότητα της μετάλλαξης ήταν στα ίδια περίπου επίπεδα μεταξύ των δύο φύλων. Κάποια από τα άτομα που εξετάστηκαν είχαν παρουσιάσει οικογενειακό ιστορικό για την πάθηση που μελετήσαμε, όμως δεν υπήρχε συσχέτιση με την συχνότητα εμφάνισης του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου.

Τελικά, υπάρχει μια υψηλή συχνότητα των γενετικών πολυμορφισμών του *CYP5A1* γονιδίου στον ελληνικό πληθυσμό, που διαφέρει στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές, και μπορεί να συνδεθεί με τις εγκεφαλικές επιθέσεις. Οι γενετικές μελέτες των πολυμορφισμών του *CYP5A1* είναι απαραίτητες για να διευκρινίσουν περαιτέρω το ρόλο αυτού του ενζύμου στην εγκεφαλαγγειακή ασθένεια.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή τη μελέτη εξετάσαμε τη συχνότητα εμφάνισης των δύο αλληλόμορφων του εξωνίου 12, το wild-type *CYP5A1\*1* και το mutant *CYP5A1\*9*, του γονιδίου *CYP5A1* σε Έλληνες ασθενείς με ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ (ΤΙΑ) και σε υγιείς μάρτυρες, από δύο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της χώρας μας. Η συχνότητα εμφάνισης του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου *CYP5A1\*9* στην ομάδα των ατόμων που μελετήσαμε ήταν συνολικά 19,7%, με ποσοστά 14,5% και 23,5% στον υπό μελέτη πληθυσμό από την Κρήτη και την Ηπειρωτική Ελλάδα αντίστοιχα. Η συχνότητα εμφάνισης των δύο αλληλόμορφων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ανάμεσα στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες. Η συχνότητα εμφάνισης του μεταλλαγμένου *CYP5A1\*9* ήταν 18,8% και 20,8% για ασθενείς και μάρτυρες αντίστοιχα, συχνότητα υψηλότερη από την συχνότητα (0,25%) στον πληθυσμό των Καυκάσιων (Γάλλων), σε σχετική μοναδική μελέτη που έχει γίνει μέχρι τώρα σε 200 υγιείς μάρτυρες (Chevalier et al, 2001).

Οι Chevalier D et al, 2001, βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι η ποικιλομορφία του γονιδίου *CYP5A1* μπορεί να παίζει ένα σπουδαίο ρόλο στις ανθρώπινες ασθένειες, όπως είναι η αθηροσκλήρωση, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το εγκεφαλικό επεισόδιο και το άσθμα, έκαναν διαλογή των πολυμορφισμών της αλληλουχίας του γονιδίου *CYP5A1* που θα μπορούσαν να τροποποιήσουν είτε την μεταγραφή του γονιδίου *CYP5A1*, είτε τη θεωρούμενη πρωτεΐνη που προέρχεται από μετάφραση του *CYP5A1* mRNA. Εξέτασαν το γενομικό DNA 200 υγιή ατόμων για μεταλλαγές στην περιοχή του υποκινητή, στις πρωτεϊνικές κωδικές αλληλουχίες και την 3'-μη μεταφρασμένη περιοχή του *CYP5A1*, με τη μεθοδολογία PCR-SSCP. Ταυτοποιήθηκαν έντεκα πολυμορφισμοί στο *CYP5A1* γονίδιο, συμπεριλαμβανομένων οκτώ missense μεταλλαγών R61H,

D161E, N246S, L357V, Q417E, E450K, T451N και R466Q και τριών silent μεταλλαγών (360G>A στο εξώνιο 5, 1425C>T στο εξώνιο 12 και στην 3'-μη μεταφρασμένη περιοχή του γονιδίου). Αυτή είναι η πρώτη αναφορά στους γενετικούς πολυμορφισμούς του ανθρώπινου *CYP5A1* γονιδίου όπου γίνεται αλλαγή της πρωτεϊνικής αλληλουχίας.

Κάθε αλληλόμορφο του γονιδίου ονομάστηκε σύμφωνα με την ονοματολογία των γονιδίων του κυτοχρώματος P450. Το wild-type αλληλόμορφο του γονιδίου, οριζόμενο ως *CYP5A1\*1* στη μελέτη αυτή από τους Γάλλους είναι το συχνότερο (91,75%). Όλες οι άλλες αλληλόμορφες παραλλαγές είναι σπάνιες (συχνότητα <2%) στο γαλλικό καυκάσιο πληθυσμό. Εντούτοις, όπως καταγράφεται στη βιβλιογραφία σε άλλους πολυμορφισμούς του κυτοχρώματος P450, υπάρχει μια πιθανότητα αυτές οι συχνότητες μεταλλαγής να είναι διαφορετικές σε άλλες εθνικές ομάδες όπως φαίνεται και από την δική μας μελέτη στον Ελληνικό πληθυσμό (Tanaka E, 1999).

Στον Γαλλικό Καυκάσιο πληθυσμό, όπως φαίνεται στον πίνακα 4.1. η συχνότητα του αλληλομόρφου *CYP5A1\*9*, το οποίο και εξετάσαμε στην μελέτη που διεξήγαμε, είναι 0,25% για τον υγιή πληθυσμό. Η διαφορά είναι αρκετά μεγάλη, αν συγκρίνουμε την συχνότητα αυτή, με την συχνότητα του ίδιου αλληλομόρφου στον ελληνικό πληθυσμό η οποία φτάνει το 19,7% για το σύνολο ασθενών και μαρτύρων και το 20,8% για τους μάρτυρες της δικής μας έρευνας. Έτσι, επιβεβαιώνεται η δυνατότητα της ύπαρξης διαφορετικών συχνοτήτων ανά διαφορετικές εθνικές ομάδες όπως αναφέρεται στην διεθνή βιβλιογραφία. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η διαφορά στην εμφάνισή των δύο αλληλόμορφων μεταξύ των δύο υπο-ομάδων του Ελληνικού πληθυσμού, της ομάδας από την Κρήτη και της ομάδας από την Ηπειρωτική Ελλάδα. Αυτή η διαφορά παρατηρήθηκε ακόμη και όταν οι ασθενείς αναλύθηκαν χωριστά από τους υγιείς μάρτυρες. Διαφορετική συχνότητα μεταλλάξεων μεταξύ ομάδων

διαφορετικών εθνικοτήτων και υποπληθυσμών έχουν περιγραφεί και για άλλους πολυμορφισμούς του κυτοχρώματος P450 (Marez D et al,1999).

**Πίνακας 4.1** Κατανομή των αλληλομόρφων *CYP5A1*\* που ταυτοποιήθηκαν με PCR-SSCP σε 200 δείγματα υγιών μαρτύρων Καυκάσιας καταγωγής. *D. Chevalier et al. / Mutation Research Genomics 432 (2001) 61–67*

SSCP στο)	(ανιχνεύτηκε	Φύση και θέση της μεταλλαγής* <sup>1</sup>	Ονομασία αλληλομόρφου	Συνέπεια	Συχνότητα αλληλομόρφου (n=400) (%) <sup>*2</sup>
--------------	--------------	---	-----------------------	----------	--

Exon 2	182G>A	CYP5A1*2	R61H	0.75
Exon 9	1069C>G	CYP5A1*5	L357V	0.25
Exon 11	1249C>G	CYP5A1*6	Q417E	0.75
	1348G>A	CYP5A1*7	E450K	2.00
	1352C>A	CYP5A1*8	T451N	1.75
Exon12	1397G>A	CYP5A1*9	R466Q	0.25
	1425C>T	CYP5A1*1C	Silent	0.25
3'-UTR region	1727A>G	CYP5A1*1D	nd	0.25

\*<sup>1</sup> Η θέση αναφέρεται στην περιοχή έναρξης της μετάφρασης ATG ως +1

\*<sup>2</sup> n: αριθμός αλληλομόρφων nd: μη καθορισμένη

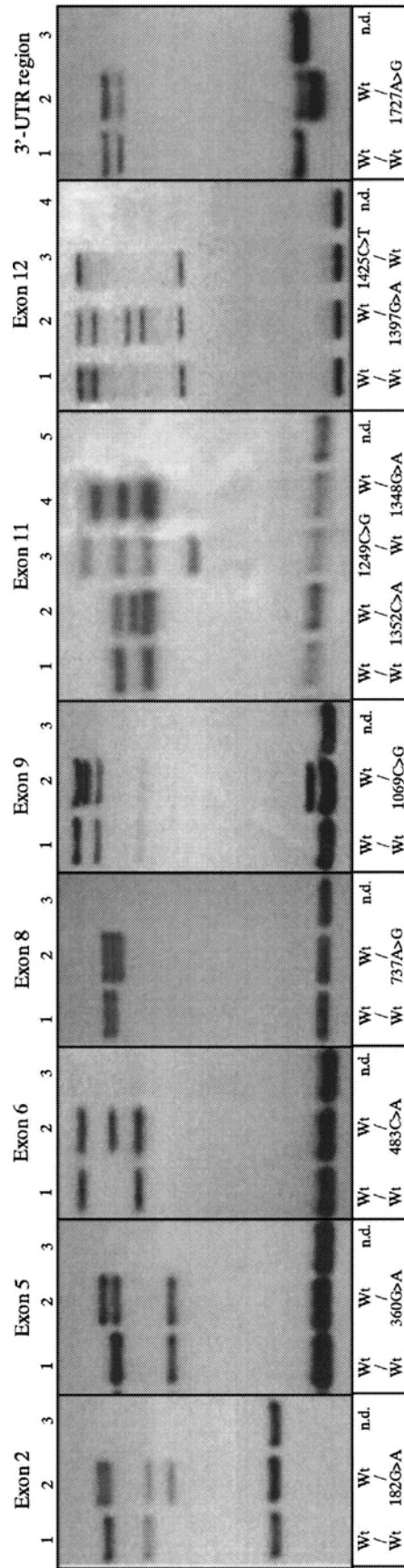


Fig. 1. PCR-SSCP analysis of the human CYP5A1 gene. The 13 exons and their flanking consensus sequences, the promoter region and the 3'-untranslated region were separately amplified from genomic DNA of 200 individuals. Different SSCP patterns were distinguished and results from sequencing analysis of the corresponding mutated region are reported at the bottom of the gel. The first lane contains a reference sample with a wild-type genotype (lanes 1, Wt/Wt), followed by the polymorphic samples. The last lane contains a not denatured sample (n.d.) to locate the position of double-stranded DNA.

Η έκφραση των δύο αλληλόμορφων στην μελέτη μας δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες. Παρόλα αυτά, οι ασθενείς με επαναλαμβανόμενα ΑΕΕ παρά την προφυλακτική λήψη ασπιρίνης έφεραν περισσότερο το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *CYP5A1\*9* αντί για το wild-type αλληλόμορφο *CYP5A1\*1*, ακόμα και μετά την μεταβολή των κοινών παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο. Η σπουδαιότητα αυτής της συσχέτισης παραμένει αδιευκρίνιστη αλλά το γεγονός της αυξημένης συχνότητας του *CYP5A1\*9* σε ασθενείς με επαναλαμβανόμενα ΑΕΕ ενώ λαμβάνουν ασπιρίνη, που παραμένει και μετά την μεταβολή των παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, ίσως υποδηλώνει ανεξάρτητη επίδραση αυτού του αλληλόμορφου στη μεταβολική οδό του αραχιδονικού οξέος. Ομοίως υπήρξε στατιστικά σημαντική επικράτηση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στους ασθενείς με ΑΕΕ με ιστορικό προηγούμενου εγκεφαλικοαγγειακού επεισοδίου σε σύγκριση με αυτούς που ήταν ελεύθεροι ιστορικού ( $p < 0.01$ ).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσχέτιση ανάμεσα στο αλληλόμορφο *CYP5A1\*9* και στην υπέρταση όπως και τον Σ.Δ που καταγράφηκε στον υπό μελέτη πληθυσμό. Ανάμεσα στους ασθενείς με ΑΕΕ, η παρουσία του wild-type *CYP5A1* αλληλόμορφου ήταν πιο συχνή στους υπερτασικούς και λιγότερο στους διαβητικούς. Ενδιαφέρουσες είναι επίσης όλες οι συσχετίσεις στους ασθενείς με ΑΕΕ βάσει του μέρους καταγωγής. Αυτό μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο για την επίπτωση του *CYP5A1* στην παθογένεια της νόσου κατά γεωγραφικό διαμέρισμα.

Η κατανομή του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου δε διέφερε μεταξύ των υποτύπων ισχαιμικού ΑΕΕ της μελέτης μας, κάτι που προφανώς τονίζει το βασικό ρόλο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην παθογένηση της νόσου. Αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον για τα lacunar ισχαιμικά, των οποίων η παθογένεια θεωρείται διαφορετική από τα υπόλοιπα ισχαιμικά εγκεφαλικά (Davis SM et al, 2004).



Περιοριστικός παράγοντας στην ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων είναι το ότι η μεταβολική δραστικότητα των γενετικών πολυμορφισμών του *CYP5A1* δεν έχει μελετηθεί ακόμη σε βάθος. Ενδιαφέρον παρόλα αυτά ήταν ότι το αλληλόμορφο *CYP5A1\*9* εμφανίζει αντικατάσταση κοντά στην περιοχή σύνδεσης της αίμης στο ένζυμο (Chevalier D et al, 2001). Μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή μπορούν να ενεργοποιήσουν την ενζυμική δραστηριότητα της συνθετάσης της θρομβοξάνης, από την βλάβη της σύνδεσης της αίμης. Οι αντικαταστάσεις N246S και L357V έχουν επιπτώσεις στον έλικα F και στον έλικα I της περιοχής σύνδεσης της αίμης αντίστοιχα, και το R466Q (*CYP5A1\*9*) βρίσκεται κοντά στην ακολουθία συναίνεσης του δεσμευτικού πεπτιδίου της αίμης. Αυτές οι παραλλαγές μπορεί να ασκήσουν επίδραση στην τοπολογία του *CYP5A1*, καθώς επίσης και στην καταλυτική του δραστηριότητα (Wang LH et al, 1996). Η επίδραση των παραλλαγών στη μεταβολική δραστηριότητα του *CYP5A1* παραμένει για να αξιολογηθεί περαιτέρω.

Η υπερέκφραση του *CYP5A1\*9* στον ελληνικό πληθυσμό σε σχέση με την μοναδική μελέτη των Γάλλων, ερμηνεύεται σε αυτό το πλαίσιο, πως ίσως δηλώνει έναν πληθυσμό που κινδυνεύει από επαναλαμβανόμενα ισχαιμικά ΑΕΕ παρά την προφυλακτική λήψη ασπιρίνης εξαιτίας της ελαττωματικής λειτουργίας της συνθετάσης της θρομβοξάνης.

Προηγούμενες μελέτες πρότειναν ότι το *CYP5A1* είναι αντικείμενο για ρύθμιση πολλαπλών επιπέδων *in vivo*. Ένας πρώτος μηχανισμός ελέγχου είναι η αδρανοποίηση του κυτταρικού θανάτου, όπου το *CYP5A1* υποβάλλεται σε γρήγορη και μη αναστρέψιμη καταλυτική αδρανοποίηση από το υπόστρωμα του, τη PGH<sub>2</sub> (Jones DA et al, 1991). Πιο πρόσφατα, ένας δεύτερος μηχανισμός ελέγχου έχει περιγραφεί ως φαινόμενο εναλλακτικού ματίσματος του μεταγράφου *CYP5A1*. Το εναλλακτικό μάτισμα παρέχει ένα μηχανισμό περιορισμού της κυτταρικής βιοσύνθεσης της θρομβοξάνης A<sub>2</sub>. Σε διάφορες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές έχει αναφερθεί ένα

κυκλικό *CYP5A1* mRNA που στερείται ολόκληρο το εξώνιο 12 που κωδικοποιεί την περιοχή δέσμευσης της αίμης του ένζυμου. Η κωδική πρωτεΐνη του κυκλικού αυτού μεταγράφου δεν εμφανίζει ενζυμική ενεργότητα. Σε αυτό το πλαίσιο η συχνότητα και το αξιοσημείωτο εναλλακτικό μάτισμα το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη του εξωνίου 12 χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση (Xia Z et al, 1993). Η επίδραση των πολυμορφισμών και σε άλλες περιοχές του γονιδίου αξίζει επίσης περαιτέρω διερεύνησης.

Η εκτίμηση της συσχέτισης ανάμεσα στον πολυμορφισμό του *CYP5A1* και στα καθέξιν ΑΕΕ φυσικά περιορίζεται από την διασταυρούμενη τμηματικά φύση των δεδομένων μας. Δυστυχώς η διάρκεια χρήσης της ασπιρίνης δεν μπορούσε με ακρίβεια να υπολογιστεί για μεγάλη μερίδα του πληθυσμού με ΑΕΕ και αυτό ήταν εμπόδιο στην εφαρμογή χρονό-εξαρτώμενης προσέγγισης. Σημειώσαμε παρόλα αυτά αξιοσημείωτη αύξηση της συχνότητας του *CYP5A1\*9* σε ασθενείς με ένα ή πολλαπλά επαναλαμβανόμενα ΑΕΕ, ενώ έπαιρναν ασπιρίνη, συγκρινόμενοι με αυτούς που η δευτερογενής προφυλακτική αγωγή με ασπιρίνη ήταν επιτυχής. Άλλος ένας περιορισμός στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας ήταν η απουσία εγγυημένου δείκτη (marker) στον υπολογισμό της συμμόρφωσης που είχαν οι ασθενείς στο να λαμβάνουν σωστά την ασπιρίνη. Επιπρόσθετα ο βαθμός της υποκείμενης βλάβης του ενδοθηλίου των αγγείων, ο οποίος συμβάλλει δυναμικά στην εξέλιξη της νόσου δε μπορούσε να προσδιοριστεί.

Παρά τους παραπάνω περιορισμούς, αυτή η μελέτη παρέχει απόδειξη για την υψηλή επικράτηση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου *CYP5A1\*9* στον Ελληνικό πληθυσμό. Τα ευρήματά μας επίσης υποδηλώνουν ότι η παρουσία της μετάλλαξης επηρεάζει την θέση σύνδεσης της αίμης στο ένζυμο, και πιθανότατα συσχετίζεται με επαναλαμβανόμενα ΑΕΕ σε ασθενείς όπου απέτυχε η δευτερογενής προφύλαξη με ασπιρίνη.

Σε μοριακό επίπεδο το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί το *CYP5A1* περιέχει 13 εξώνια και 12 ιντρόνια, με μέγεθος 150kb (Tazawa R et al, 1996). Έχει καταγραφεί ένας γενετικός πολυμορφισμός του *CYP5A1*, μιας δινουκλεοτιδικής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (CA) που ταυτοποιήθηκε στο ένατο ιντρόνιο του γονιδίου και έχουν ανιχνευτεί τέσσερα διακριτικά αλληλόμορφα, που περιέχουν από 13 έως 20 αντίγραφα της επανάληψης CA (Baek SJ et al, 1996). Στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου, έχει ταυτοποιηθεί μία εγγύς θετική ρυθμιστική αλληλουχία. Αυτές οι περιοχές έχει δειχθεί ότι κατέχουν στοιχεία σημαντικά για την έκφραση του γονιδίου *CYP5A1* (Lee KD et al, 1996).

Οι μεταλλάξεις είναι διαφορές στην αλληλουχία του DNA σε ένα άτομο που είναι σπάνιες και μπορεί να είναι μοναδικές στο συγκεκριμένο άτομο (ή στην οικογενειακή γραμμή). Οι πολυμορφισμοί είναι διαφορές στην αλληλουχία του DNA που βρίσκονται σε πολλά άτομα σε μία συγκεκριμένη συχνότητα (συνήθως στο 1% ή/και παραπάνω του πληθυσμού). Οι πολυμορφισμοί ξεκινάνε ως μεταλλάξεις, άλλα αν καθιερωθούν στον πληθυσμό και πετύχουν επαρκή συχνότητα, γίνονται πολυμορφισμοί. Λόγω του γεγονότος ότι στην μελέτη αυτή το μελετηθέν αλληλόμορφο *CYP5A1\*9* βρέθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο του 1% το αναφέρουμε ως πολυμορφισμό και όχι ως μετάλλαξη.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η συνθάση της θρομβοξάνης παίζει ρόλο σε πολλές παθολογικές διαδικασίες, όπως τα οξεία στεφανιαία σύνδρομα. Είναι πιθανό οι παραλλαγές του γονιδίου να συνεισφέρουν στην αύξηση του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Ο Tsujita Y et al, 2000, έψαξε για παραλλαγές της περιοχής του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου *CYP5A1*, μελέτησε την φυσιολογική σημασία των ταυτοποιημένων πολυμορφισμών *in vitro* και εξέτασε την σχέση μεταξύ των ταυτοποιημένων πολυμορφισμών και των ισχαιμικών νοσημάτων της καρδιάς. Ταυτοποίησε την υποκατάσταση της C σε T στο νουκλεοτίδιο -822, και την υποκατάσταση της T σε G στο -386. Επειδή αυτοί οι δύο πολυμορφισμοί είναι στενά

συνδεδεμένοι μεταξύ τους, η μελέτη περιορίστηκε τελικά στην ανάλυση της σημασίας του πολυμορφισμού T(-386)G. Η αλληλουχία γύρω από το νουκλεοτίδιο -386 ανταποκρίνεται στη θεωρούμενη περιοχή δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1 (TTATCA), και η υποκατάσταση της T(-386) με τη G(-386) καταργεί αυτήν την περιοχή (TGATCA). Συμπερασματικά, το αλληλόμορφο G(-386) του γονιδίου της συνθετάσης της θρομβοξάνης, που έχει συσχετιστεί με υψηλότερη ενεργότητα του υποκινητή *in vitro*, φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για έμφραγμα του μυοκαρδίου στους Γιαπωνέζους.

Τα αιμοπετάλια είναι ένας άλλος παράγοντας ζωτικής σπουδαιότητας στην πορεία της αρτηριακής θρόμβωσης στο ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο. Η εμφρακτική θρόμβωση ξεκινάει με την αλληλεπίδραση του παράγοντα von Willebrand (vWf) και της γλυκοπρωτεΐνης των αιμοπεταλίων (GP) Iba. Τρεις πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί στην GP Iba [Kozak T/C polymorphism, VNTR (variable number of tandem repeats) και το ανθρώπινο αντιγόνο των αιμοπεταλίων 2a [HPA-2a] [Thr] ή HPA-2b [Met] στην θέση 145], ο καθένας από τους οποίους μπορεί να προάγει την αλληλεπίδραση των vWf και των GP Iba (Wagner KR et al, 1998).

Οι Baker et al, 2001 μελέτησαν το αν αυτοί οι πολυμορφισμοί είναι υποψήφια γονίδια για το πρώτο ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα, ότι ο πολυμορφισμός Kozak T/C, που σχετίζεται με μια αύξηση στην έκφραση της επιφανειακής GP Iba, είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την πρόκληση του πρώτου ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου.

Τα αντιφατικά αποτελέσματα των ερευνών που εξετάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου σε σχέση με γενετικές παραλλαγές αιμοπεταλιακών γλυκοπρωτεϊνών μπορεί να οφείλονται, εν μέρει, σε διαφορές των δημογραφικών χαρακτηριστικών μεταξύ των μελετηθέντων πληθυσμών. Για παράδειγμα, οι γενετικοί προθρομβωτικοί παράγοντες μπορεί να είναι πιο σημαντικοί

σε νεότερα άτομα ή σε γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση που είναι λιγότερο πιθανό να πάσχουν από αθηροσκληρωτική ασθένεια. Επιπλέον, η επίδραση μοναδικών γενετικών παραγόντων στον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου μπορεί να είναι μικρότερης στατιστικής σημασίας όταν αναλύεται ατομικά, αλλά μπορεί να αποδεικτεί πιο σημαντική με την παρουσία κοινών γενετικών ή περιβαλλοντικών καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου (π.χ. υπέρταση, κάπνισμα, παχυσαρκία).

Οι Reiner AP et al, 2000, εξέτασαν την σχέση 5 κοινών πολυμορφισμών αιμοπεταλιακών γλυκοπρωτεϊνών με το εγκεφαλικό επεισόδιο σε νέες γυναίκες μικρότερες των 45 ετών και μελέτησαν τις πιθανές αλληλεπιδράσεις με αυτές τις γενετικές παραλλαγές και άλλους παραδοσιακούς καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου. Η παραλλαγή 807T της γλυκοπρωτεΐνης Ia συσχετίστηκε με το αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Διάφορες κληρονομικές αιμοπεταλιακές παραλλαγές γλυκοπρωτεϊνών μπορεί να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου σε νέες γυναίκες. Αυτές οι συσχετίσεις φάνηκε να επιβεβαιώνονται σε γυναίκες με άλλους καρδιαγγειακούς παράγοντες.

Οι υποδοχείς γλυκοπρωτεϊνών (GP) IIb/IIIa διαδραματίζουν έναν αναπόφευκτο ρόλο στη συνάθροιση αιμοπεταλίων. Το γονίδιο GP IIIa είναι πολυμορφικό (PIA1/PIA2) και η παρουσία ενός αλληλόμορφου γονιδίου PIA2 μπορεί να συνδεθεί με αυξανόμενο κίνδυνο για το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS).

Οι Papp E et al, 2005 υποστήριξαν την υπόθεση ότι οι φορείς του αλληλόμορφου γονιδίου PIA2 μπορεί αυξάνουν τον κίνδυνο για ACS. Η ομοζυγωτία PIA2 συνδέθηκε με ανεπαρκή απόκριση στη θεραπεία με ασπιρίνη. Επίσης, πρότειναν ότι οι ασθενείς με ομοζυγωτία των αλληλόμορφων γονιδίων PIA2 μπορεί να επωφελούνται από την αντιαιμοπεταλική θεραπεία για την πρόληψη του ACS.

Οι Yeh PS et al, 2004, ερεύνησαν τα αποτελέσματα των γενετικών παραγόντων στην πρόγνωση του εγκεφαλικού εμφράγματος στους νέους ενήλικους στην Ταϊβάν. Τα στοιχεία τους έδειξαν ότι οι προθρομβωτικοί γενετικοί πολυμορφισμοί δεν έχουν σημαντική επιρροή στην πρόγνωση ισχαιμικού εγκεφαλικού σε νέους, στην Ταϊβάν, λόγω της αρτηριακής θρόμβωσης ή ακαθορίστων αιτιών.

Οι Meiklejohn DJ et al, 2000, μελέτησαν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in vivo* σε οξεία θρόμβωση και τη συσχέτισαν με τον αιμοπεταλιακό γονότυπο. Αν και συνεχιζόμενη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων γίνεται στο αθηροθρομβωτικό εγκεφαλικό επεισόδιο, αυτή είναι ανεξάρτητη των γονοτύπων HPA 1a/1b και 2a/2b. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν μια συνεπαγόμενη προθρομβωτική κατάσταση, αλλά δεν υποστηρίζουν τους πολυμορφισμούς που μελετώνται ως παράγοντες κινδύνου για θρομβωτικό εγκεφαλικό επεισόδιο στον πληθυσμό που μελετήθηκε.

Οι Meschia JF et al. 2003 στο “The Ischemic Stroke Genetics Study (ISGS) Protocol”, αναφέρουν ότι η μοριακή βάση για τον γενετικό κίνδυνο του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου μπορεί να είναι πολυγονιδιακή και να επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Πολλές μικρές “*case-control*” μελέτες έχουν προτείνει συσχετισμούς μεταξύ του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και πολυμορφισμών γονιδίων που κωδικοποιούν διαδοχικές πρωτεΐνες πήξης και υποδοχείς αιμοπεταλίων.

Οι Dai K et al, 2001, αναφέρουν ότι ο πολυμορφισμός Sma I σχετίζεται με τον αυξανόμενο κίνδυνο οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Εντούτοις, δε βρέθηκαν συσχετισμοί μεταξύ αυτού του πολυμορφισμού και του AMI. Αυτός ο πολυμορφισμός του vWF μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν πρόσφατα ταυτοποιημένο παράγοντα κινδύνου για οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο στο Κινέζους.

Οι Goor van MR et al, 2002, ήθελαν να μελετήσουν την πιθανή σχέση μεταξύ των πολυμορφισμών GPIIb/IIIa P1A1/A2 και της παρουσίας κρυπτογενούς εγκεφαλικού επεισοδίου σε νέους ασθενείς. Η μεμβρανική αυτή αιμοπεταλιακή γλυκοπρωτεΐνη είναι

μέλος της οικογένειας των ιντεγκρινών, των συγκολλητικών μορίων που δεσμεύοντας το ινωδογόνο, προάγουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και την θρόμβωση μαζί με τον παράγοντα von Willebrand. Αυτή η μελέτη δεν υποστηρίζει την σχέση μεταξύ των πολυμορφισμών P1A1/A2 και του κρυπτογενούς εγκεφαλικού επεισοδίου ή του TIA σε ασθενείς ηλικίας 45 ετών ή λιγότερο.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα την αιμοπεταλιακής γλυκοπρωτεΐνης IIIa (GPIIIa), έχει πολυμορφισμό (PI<sup>A1/A2</sup>). Σε προηγούμενες μελέτες, οι άντρες με οξύ στεφανιαία ισχαιμία ήταν πιο πιθανό να έχουν το αλληλόμορφο PI<sup>A2</sup> απ' ότι οι υγιείς μάρτυρες. Αυτός ο υποδοχέας έχει ένα σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό οξύ θρόμβου. Αυτά τα ευρήματα αίρουν την πιθανότητα ύπαρξης κληρονομούμενων αιμοπεταλικών παραγόντων κινδύνου και για αρτηριακή και για φλεβική θρόμβωση.

Οι Ridker PM et al, 1997, εξέτασαν το αν το αλληλόμορφο PI<sup>A2</sup> σχετίζεται με το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το εγκεφαλικό επεισόδιο και τη φλεβική θρόμβωση σε μια ομάδα φαινομενικά υγιών ανδρών στις ΗΠΑ. Η μελέτη δεν έδειξε στοιχεία συσχέτισης σε αναλύσεις των υποομάδων με την ηλικία, την κατάσταση καπνίσματος και την παρουσία οικογενειακού ιστορικού πρόωρης στεφανιαίας νόσου, υπερχοληστερολαιμίας, υπέρτασης ή διαβήτη. Η χρήση ασπιρίνης δεν είχε επίδραση στα ευρήματα. Οι φορείς του αλληλομόρφου GPIIIa PI<sup>A2</sup> δεν συσχετιζόνταν με αύξηση του συνακόλουθου κινδύνου εμφράγματος του μυοκαρδίου, εγκεφαλικού επεισοδίου ή φλεβικής θρόμβωσης.

Οι Kekomaki S et al, 1999, σε μελέτη που έκαναν στην Φινλανδία, αναφέρουν ότι πρόσφατα έχει προταθεί ότι ο πολυμορφισμός Leu33Pro της γλυκοπρωτεΐνης των αιμοπεταλίων IIIa έχει επιπτώσεις στον κίνδυνο στεφανιαίας θρόμβωσης. Η Φινλανδία είναι γενετικά απομονωμένη και έχει συχνότητα καρδιαγγειακών πάθησεων μεταξύ των υψηλότερων στον κόσμο. Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, η επικράτηση των ισχαιμικών καρδιακών παθήσεων ποικίλλει επίσης στα διαφορετικά μέρη της χώρας,

και είναι υψηλότερη στην ανατολική Φινλανδία. Ωστόσο δε μπόρεσαν να επιβεβαιώσουν την αρχική παρατήρηση ότι το αλληλόμορφο γονίδιο Pro33 αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ασθένεια των στεφανιαίων αρτηριών. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διευκρινίσουν εάν η συμεμφάνιση της Pro33 και μερικών μη αναγνωρίσιμων κληρονομικών παραγόντων θέτουν έναν πρόσθετο κίνδυνο αγγειακής ασθένειας.

Είναι γνωστό ότι τα αγγειακά εγκεφαλικά είναι μια πολυπαραγοντική νόσος όπως αποδεικνύεται και από την δικιά μας μελέτη. Χρειάζεται συνεχή επαγρύπνιση και διαρκή επιστημονική έρευνα, για να υπάρχουν συνεχή δεδομένα και στοιχεία σημαντικά για τη παθογένεια και αντιμετώπιση αυτής της νόσου με την υψηλή θνητότητα και θνησιμότητα.

## **5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Σε αυτή την μελέτη εξετάσαμε τη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων του εξωνίου 12 του γονιδίου της συνθετάσης της θρομβοξάνης (*CYP5A1*) σε Έλληνες ασθενείς με ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ/ΤΙΑ και σε υγιείς μάρτυρες, καταλήγοντας στα εξής συμπεράσματα:

- Η έκφραση των αλληλόμορφων του *CYP5A1* στην μελέτη μας δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες.
- Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαφορά στην εμφάνισή του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου *CYP5A1\*9* μεταξύ των δύο υπο-ομάδων του Ελληνικού πληθυσμού. Η επίπτωσή του μεταξύ των ασθενών από την Κρήτη ήταν χαμηλότερη σε σχέση με την επίπτωσή του στους ασθενείς από την Ηπειρωτική Ελλάδα.



- Ανάμεσα στους ασθενείς με ΑΕΕ, η παρουσία του wild-type *CYP5A1\*1* αλληλόμορφου ήταν πιο συχνή στους υπερτασικούς και λιγότερο στους διαβητικούς.
- Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *CYP5A1\*9* ήταν στατιστικά σημαντικά περισσότερο επικρατές σε αυτούς με επαναλαμβανόμενα ΑΕΕ ενώ έπαιρναν ασπιρίνη, συγκριτικά με αυτούς με επιτυχημένη δευτερογενή προφυλακτική θεραπεία με ασπιρίνη.
- Υπάρχει στατιστικά σημαντική επικράτηση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στους ασθενείς με ΑΕΕ με ιστορικό προηγούμενου εγκεφαλικοαγγειακού επεισοδίου σε σύγκριση με αυτούς που ήταν ελεύθεροι ιστορικού ( $p < 0.01$ ).
- Η κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων δε διέφερε μεταξύ των υπο-τύπων ισχαιμικού ΑΕΕ της μελέτης μας, γεγονός που τονίζει το βασικό ρόλο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην παθογένηση της νόσου.
- Αναφορικά με τους τύπους ΑΕΕ, το μεταλλαγμένο *CYP5A1\*9* ήταν επικρατέστερο σε ασθενείς με νόσο μικρών αγγείων και λιγότερο σε αυτούς με ΤΙΑ συγκρινόμενο με ασθενείς με νόσο μεγάλων αγγείων, αλλά χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά.
- Δεν υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των αλληλόμορφων του γονιδίου *CYP5A1* και στην ηλικία, το και την παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο (οικογενειακό ιστορικό, παχυσαρκία, τιμή CRP κ.ά).

Επομένως, τα αποτελέσματα της μελέτης που διεξήγαμε, σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις άλλων ερευνών που έγιναν πάνω στα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, μας οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια είναι μια

ιδιαιτέρως πολυπαραγοντική νόσος. Η πρόκληση ενός εγκεφαλικού επεισοδίου δεν θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της μετάλλαξης ενός γονιδίου ή της ύπαρξης ενός πολυμορφισμού μονάχα, αλλά αποτέλεσμα του συνδυασμού γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων όσο και παθολογικών καταστάσεων του εκάστοτε οργανισμού.

Η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μας μένει να προσδιοριστεί σε άλλους πληθυσμούς και ομάδες εθνικοτήτων. Επιπρόσθετα μελέτες των άλλων πολυμορφισμών που περιγράφονται για το γονίδιο CYP5A1 μένει να προσδιορίσουν το ρόλο του ενζύμου της συνθετάσης της θρομβοξάνης στη νόσο των αγγειακών εγκεφαλικών.

## **6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Adams R et al (2001). **Principles of Neurology**. McGraw-Hill Inc

➤ Altman R et al (2004). **The antithrombotic profile of aspirin. Aspirin resistance or simply failure?** Thromb J, 2:1

➤ Chevalier D et al (2001). **Identification of genetic variants in the human thromboxane synthase gene (CYP5A1).** Mutation research genomics; 432:61-7.

➤ Culebras A et al (1997). **Practice Guidelines for the Use of Imaging in Transient Ischemic Attacks and Acute Stroke: A Report of the Stroke Council,** American Heart Association. Stroke 28: 1480-1497

**Associated with Acute Ischemic Stroke.** Thrombosis Research

- Davis SM et al (2004). **Why lacunar syndromes are different and important.** Stroke; 35: 1780–81
- Dialyna IA et al (2003). **Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk.** Oncol Rep; 10:1829-35.

- Freitas GR et al. (2001). **Primary stroke prevention.** European Journal of Neurology  
8:1-15

➤ Iadecola C et al (2001). **Cerebral ischemia and inflammation.** Current Opinion in Neurology 14:89-94

➤ Lee KD et al (1996). **Multiple factors regulating the expression of human thromboxane synthase gene.** Biochem. J. 319, 783-791

- Loll PJ et al (1994). **The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase.** Nat Struct Biol, 2:637-643
- Marez D et al (1997). **Polymorphism of the cytochromeP450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution.** Pharmacogenetics; 7: 193–202
- Meiklejohn DJ et al (2000). **In vivo platelet activation in atherothrombotic stroke is not determined by polymorphisms of human platelet glycoprotein IIIa or Ib.** British Journal of Haematology
- Meschia JF et al (2003). **The Ischemic Stroke Genetics Study (ISGS) Protocol.** BMC Neurology
- Mestel F et al (1980). **Severe bleeding associated with defective thromboxane synthetase.** Lancet; 1:157.
- Miyata A et al (1994). **Characterization of the human gene (TBXAS1) encoding thromboxane synthase.** Eur J Biochem
- Moncada S et al (1979). **Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls.** N Engl J Med 17: 1142-1147





- Needleman P et al (1986). **Arachidonic acid metabolism.** Annu Rev Biochem 55 : 69-102

- Omura T et al (1964). **The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature.** J Biol Chem 239: 2370-2378.
- Tanaka E (1999). **Genetic polymorphism of drug metabolising enzymes in humans.** J Clin Pharm Ther 24: 323-329

- Tazawa R et al (1996). **Characterization of the Complete Genomic Structure Of Human Thromboxane Synthase Gene and Functional Analysis of its Promoter.** Archives of Biochemistry and Biophysics Vol.334, No.2 pp. 349-356
  
- Zhang L et al (1993). **Molecular cloning and expression of murine thromboxane synthase.** Biochemical and biophysical research communications Vol.194. No.2 p.741-748

## **Μέρος δεύτερο**

### **Παράλληλο ερευνητικό έργο**

### **Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα CX3CR1 της FKN σε ασθενείς με συμπτωματική κα μη συμπτωματική στένωση των καρωτίδων.**

#### **Πρόλογος**

Οι χημοκίνες εμπλέκονται σχεδόν σε κάθε φλεγμονώδη απάντηση και παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια ενός μεγάλου αριθμού φλεγμονωδών νοσημάτων μεταξύ των οποίων και η αθηροσκλήρωση. Η fractalkine (FKN) ή CX3CL1 χημοκίνη και ο υποδοχέας της CX3CR1, αποτελούν έναν ισχυρό τέτοιο χημειοτακτικό παράγοντα. Δύο μη συνώνυμοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο του CX3CR1 υποδοχέα, ο T280M και ο V249I. Σκοπός της μελέτης μας είναι να δώσουμε νέα δεδομένα του ρόλου των πολυμορφισμών του CX3CR1 υποδοχέα στα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια, στο ρόλο τους στην αθηρωμάτωση των καρωτίδων και σε υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας. Χρησιμοποιήθηκε μια

ομάδα 150 ασθενών (με αθηρωματώση των καρωτίδων) και μια ομάδα 151 μαρτύρων (χωρίς). Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών *CX3CR1-T280M* και *CX3CR1-V249I* εφαρμόστηκε η μεθοδολογία PCR-RLFP. Τα γονοτυπικά δεδομένα τα συγκρίναμε με τους παράγοντες κινδύνου για αγγειοεγκεφαλικά επεισόδια. Οι υποτύποι των εγκεφαλικών σε σχέση με την αθηρωμάτωση των καρωτίδων αναλύθηκαν χωριστά. Μετά από αυτή την ανάλυση καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η απουσία του M280 αλληλόμορφου ήταν ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου για αθηρωμάτωση των καρωτίδων (OR 3.70, 95% CI 1.92-7.14;  $p=0.001$ ). Δηλαδή υπάρχει 4 φορές μεγαλύτερος κίνδυνος για αθηρωμάτωση των καρωτίδων σε απουσία του M280 αλληλόμορφου, μεγάλης στατιστικής σημασίας. Αυτός ο παράγοντας κινδύνου είναι μεγαλύτερης επικινδυνότητας από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα, ΣΔ, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία) και ανεξάρτητος από αυτούς. Επίσης η συχνότητα της εμφάνισης του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου I249 ήταν συχνότερη στην ομάδα των μαρτύρων σε σχέση με τους ασθενείς αλλά χωρίς ιδιαίτερη στατιστική σημασία. Μελετήθηκε επίσης μια ομάδα 185 ασθενών με ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ/ΤΙΑ. Από αυτή την ανάλυση για τους δύο πολυμορφισμούς V249I και T280M, δε βρέθηκε καμία συσχέτιση με αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια.

## **1.Εισαγωγή**

### **1.1. Αθηροσκλήρωση – χρόνια φλεγμονή και παθογένεια των ισχαιμικών συμβαμάτων.**

Τα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια οφείλονται σε διακοπή ή μείωση της παροχής αίματος προς το εγκεφαλικό παρέγχυμα, με αποτέλεσμα λειτουργικές και δομικές διαταραχές της περιοχής που ισχαιμεί, λόγω της ελαττωμένης παροχής οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Η παθογένεια και η παθοφυσιολογία των ΑΕΕ έχει αναφερθεί εκτενέστερα στο πρώτο μέρος αυτού του συγγράμματος. Συνοπτικά:

Η εγκεφαλική ισχαιμία οφείλεται σε απόφραξη του αγγείου που αρδεύει την περιοχή που ισχαιμεί. Τα συνηθισμένα αίτια που οδηγούν σε απόφραξη είναι δύο, η θρόμβωση και η εμβολή. Η θρόμβωση οφείλεται κατά κανόνα σε αθηρωματική νόσο των μεγάλων και μέσου εύρους αγγείων του εγκεφάλου. Το παθολογοανατομικό υπόστρωμα της αθηρωματικής νόσου είναι οι αθηρωματικές πλάκες, οι οποίες αποτελούν σημεία σχηματισμού θρόμβων, με αποτέλεσμα τη σταδιακή στένωση του αγγείου και τελικά την πλήρη απόφραξη του. Η εμβολή είναι αποτέλεσμα απόφραξης εγκεφαλικού αρτηριακού κλάδου από έμβολο, του οποίου η προέλευση και η σύσταση

ποικίλει κατά περίπτωση. Συνήθως τα έμβολα είναι αγγειογενούς ή καρδιογενούς προέλευσης. Στην πρώτη περίπτωση, τμήματα των θρόμβων που έχουν αναπτυχθεί στο τοίχωμα μεγάλων αρτηριών, κυρίως κοινή και έσω καρωτίδα είναι δυνατόν να αποσπασθούν και να αποφράξουν μικρότερους κλάδους. Σε άλλες περιπτώσεις το έμβολο αποτελείται από συσσωρευμένα αιμοπετάλια και δημιουργείται σε σημεία εξέλκωσης των αθηρωματικών πλακών. Πιο σπάνια, η εμβολή οφείλεται σε απόσπασση αθηρωματικού υλικού (Καλφάκης et al, 2002).

Η αθηροσκλήρωση είναι φλεγμονώδης διαδικασία, νόσος του αγγειακού τοιχώματος, που παίζει σημαντικό ρόλο όπως φαίνεται στην πρόκληση αγγειοεγκεφαλικών όπως και καρδιακών επεισοδίων. Γνωρίζουμε ότι η ανατομική και λειτουργική ακεραιότητα του αγγειακού ενδοθηλίου είναι απαραίτητη για την διατήρηση του αγγειακού τόνου, την ρύθμιση της παροχής αίματος, τον έλεγχο της πήκτικότητας, την πυροδότηση και έλεγχο φλεγμονωδών μηχανισμών. Η ανάπτυξη των αθηρωματικών βλαβών είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης κυτταρικών πληθυσμών του περιφερικού αίματος, (κυρίως μονοκύτταρων και Τ-λεμφοκυτταρων), με κυτταρικούς πληθυσμούς του τοιχώματος των αγγείων, (ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα). Διάφοροι προφλεγμονώδεις παράγοντες, χημειοτακτικοί παράγοντες και μόρια προσκόλλησης συμμετέχουν στην ενορχήστρωση αυτής της διαδικασίας (Ross R, 1999).

Το φυσιολογικό ενδοθήλιο ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο και εξασφαλίζει την αδιατάραχτη ροή αίματος στον αυλό του αγγείου, ενώ σε συνθήκες ηρεμίας δεν παράγει φλεγμονώδη μόρια ή μόρια προσκόλλησης. Υπό την επίδραση βλαπτικών παραγόντων το ενδοθήλιο χάνει την ικανότητα αυτορύθμισης του αγγειακού τόνου με υπεροχή των αγγειοσυσπαστικών παραγόντων και ενεργοποιεί την παραγωγή παραγόντων με προθρομβωτική και προφλεγμονώδη δράση. Η τροποποίηση αυτή

του συνόλου των λειτουργιών του ενδοθηλίου περιγράφεται με τον όρο ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Στεφανάδης Χ, 2005), (Libby P et al, 2005), (Ross R, 1999).

Παρά το γεγονός ότι η ακριβής φύση της αρχικής ενδοθηλιακής βλάβης δεν είναι σαφής, το ενδοθήλιο αντιδρά στον τραυματισμό μεταξύ άλλων με αυξημένη επιφανειακή έκφραση μορίων προσκόλλησης (Wilson PW, 1994), (Libby P et al, 2005). Λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος που κυλούν στο τραυματισμένο ενδοθήλιο παγιδεύονται από τον αυξανόμενο αριθμό μορίων προσκόλλησης και μεταναστεύουν διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων, κυρίως σε περιοχές διαταραγμένης ροής όπως ο διχασμός των αγγείων. Στον έσω χιτώνα του τραυματισμένου αγγείου, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, δεσμεύουν τροποποιημένα μόρια λιποπρωτεϊνών που αθροίζονται στο κυτταρόπλασμα τους και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (foam cells). Η συσσώρευση εκφυλισμένων μακροφάγων στον έσω χιτώνα του αγγείου οδηγεί στο σχηματισμό λιπωδών γραμμώσεων (fatty streaks). Οι λιπώδης γραμμώσεις είναι οι πρώτες αθηρωματικές βλάβες και είναι παρούσες ήδη από την βρεφική και πρώτη παιδική ηλικία. Εάν ο επιβαρυντικός παράγοντας παραμείνει η φλεγμονώδης διαδικασία συνεχίζεται και η βλάβη εξελίσσεται. Η αρχικά προστατευτική φλεγμονώδης απάντηση δρα πλέον βλαπτικά στο αρτηριακό τοίχωμα. Τα δυσλειτουργικά ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα απελευθερώνουν κυτοκίνες, χημοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που προάγουν τη μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων στον έσω χιτώνα του αγγείου και οδηγούν στον σχηματισμό πιο οργανωμένων αθηρωματικών βλαβών, τις ενδιάμεσες ή ινολιπώδεις πλάκες (fibro-fatty lesions). Σε αυτή τη φάση, οι βλάβες μπορεί να περιέχουν πολλαπλά στρώματα λείων μυϊκών κυττάρων, μακροφάγων, T-λεμφοκυττάρων και συνδετικού ιστού (Ross R, 1999), (Libby P, 2000). Κάτω από την επίδραση των προδιαθεσικών παραγόντων, οι βλάβες εξελίσσονται. Το αρτηριακό τοίχωμα αναδιαμορφώνεται με αποτέλεσμα τον



σχηματισμό των σύνθετων αθηρωματικών πλακών. Οι σύνθετες αθηρωματικές πλάκες (complicated lesions) είναι ευαίσθητες στην ρήξη, το παθοφυσιολογικό υπόβαθρο των οξέων ισχαιμικών συμβαμάτων (Ross R, 1999), (Libby P, 2001). Προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, συμμετέχουν στην ενορχήστρωση αυτής της διαδικασίας.

### **1.2. Χημοκίνες και αθηροσκλήρωση**

Οι χημοκίνες είναι χαμηλού μοριακού βάρους χημειοτακτικές κυτοκίνες με σημαντική ρυθμιστική δράση στην ενεργοποίηση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Αποτελούν μια επεκτεινόμενη οικογένεια περίπου 50 χημειοτακτικών πρωτεϊνών και 20 υποδοχέων ταξινομημένων σε τρεις υπο-οικογένειες (CC, CXC και CX3C), βάση του αριθμού και τη δομή των υπολειμμάτων κυστεΐνης στο αμινοτελικό τμήμα της πολυπεπτιδικής τους ακολουθίας. Οι χημοκίνες εμπλέκονται σχεδόν σε κάθε φλεγμονώδη απάντηση και παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια ενός μεγάλου αριθμού φλεγμονωδών νοσημάτων, μεταξύ των οποίων και η αθηροσκλήρωση. Οι χημοκίνες προκαλούν την ενεργοποίηση κυτταρικών μηχανισμών με τη δέσμευση τους σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κύτταρων στόχων. Οι υποδοχείς των χημοκινών αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές και είναι συζευγμένοι με την πρωτεΐνη-G. Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον στην πρόσφατη βιβλιογραφία για τον ρόλο των χημοκινών στην αθηροσκλήρωση. Οι χημοκίνες έχουν εμπλακεί σε ουσιαστικές πτυχές της αθηρογένεσης όπως η στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα, καθώς και η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs) στις αθηρωματικές πλάκες (Reap TJ et al, 1999), (Apostolakis S et al, 2006). Η συμμετοχή των χημοκινών σε σημαντικούς μηχανισμούς της αθηρογένεσης καθιστά αυτές και τους υποδοχείς τους πιθανούς μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους στην αντιμετώπιση των αγγειακών

εγκεφαλικών επεισοδίων. Στον πίνακα 1.1 έχουν καταγραφεί όλες οι χημοκίνες που εμπλέκονται στους μηχανισμούς της αθηρογένεσης.

**Πίνακας 1.1.** Χημοκίνες που έχουν εμπλακεί στους μηχανισμούς της αθηρογένεσης.

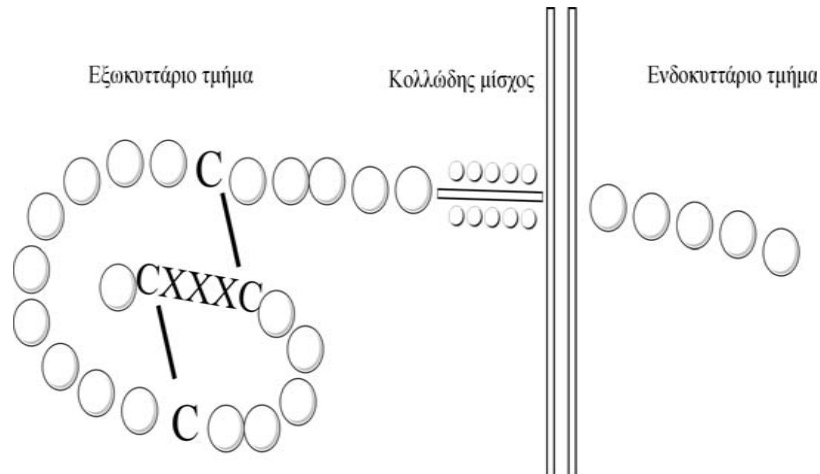
Οικογένεια	Συστηματική ονομασία	Εναλλακτικά ονόματα	Υποδοχείς	Κύρια κυτταρική πηγή	Κύρια κύτταρα στόχοι
<b>CC</b>	CCL1	I-309	CCR8	Ενδοθηλιακά κύτταρα	Μονοκύτταρα/μακροφάγα
	CCL2	MCP-1	CCR2	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα
	CCL3	MIP-1α	CCR1, CCR5	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, T -λεμφοκύτταρα	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα
	CCL4	MIP-1β	CCR5	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, T -λεμφοκύτταρα	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα
	CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, T -κύτταρα, αιμοπετάλια	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα
	CCL11	EOTAXIN	CCR3	Λεία μυϊκά κύτταρα	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, μαστοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα
	CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3	Ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, T -λεμφοκύτταρα,	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα
	CCL17	TARC	CCR4	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα	Th2 T-κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα
	CCL18	PARC	Unknown	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα	Resting T-κύτταρα
	CCL19	ELC	CCR7	Μονοκύτταρα/ μακροφάγα, Λεία μυϊκά κύτταρα	Ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα
	CCL22	MDC	CCR7	Μονοκύτταρα/ μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα	Ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα

**Πίνακας 1.1.** Χημοκίνες που έχουν εμπλακεί στους μηχανισμούς της αθηρογένεσης (Συνέχεια).

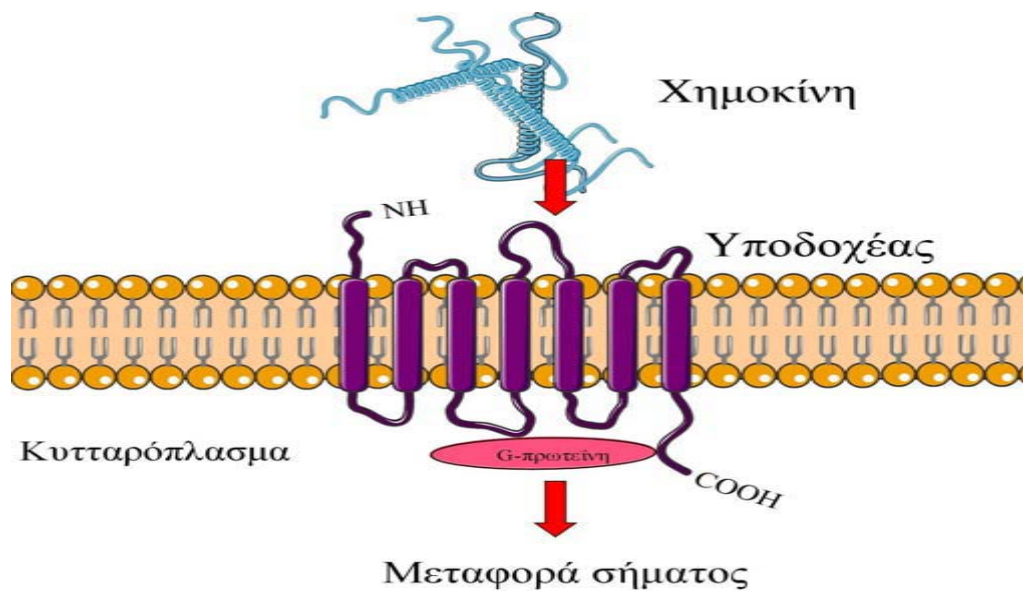
Οικογένεια	Συστηματική ονομασία	Εναλλακτικά ονόματα	Υποδοχείς	Κύρια κυτταρική πηγή	Κύρια κύτταρα στόχοι
CXC	CXCL1	GRO-α	CXCR2	Μονοκύτταρα/μακροφάγα ενδοθηλιακά κύτταρα	Μονοκύτταρα/μακροφάγα
	CXCL4	PF4	Unknown	Αιμοπετάλια, μονοκύτταρα/μακροφάγα	Ενδοθηλιακά κύτταρα
	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Μονοκύτταρα/μακροφάγα	Ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, Λεία μυϊκά κύτταρα
	CXCL9	MIG	CXCR3	Ενδοθηλιακά κύτταρα μονοκύτταρα/μακροφάγα	Ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα
	CXCL10	IP-10	CXCR3	Ενδοθηλιακά κύτταρα μονοκύτταρα/μακροφάγα, Λεία μυϊκά κύτταρα	Ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα
	CXCL11	I-TAC	CXCR3	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα	Ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα
	CXCL12	SDFI-α	CXCR4	Μονοκύτταρα/μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα	T-λεμφοκύτταρα, αιμοπετάλια, λεία μυϊκά κύτταρα
<b>CX3C</b>	<b>CX3CL1</b>	<b>Fractalkine</b>	<b>CX3CR1</b>	<b>Ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα</b>	<b>Μονοκύτταρα μακροφάγα, ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα</b>

### **1.2.1. Οι CX3C χημοκίνες και αθηροσκλήρωση**

Οι CX3C χημοκίνες χαρακτηρίζονται από μια αμινοτελική περιοχή με τρία υπολείμματα αμινοξέων να χωρίζουν τις πρώτες δύο κυστεΐνες της ώριμης πρωτεΐνης. Η fractalkine (FKN) ή CX3CL1 είναι το μοναδικό μέλος της οικογένειας των CX3C χημοκινών. Υπάρχει σε διαμεμβρανική και διαλυτή μορφή. Στην διαμεμβρανική της μορφή η FKN αποτελείται από μια εξωκυττάρια περιοχή 76 αμινοξέων συζευγμένη με έναν εκτεταμένο κολλώδη μίσχο, που ακολουθείται από την διαμεμβρανική και την ενδοκυτταρική περιοχή 34 αμινοξέων (εικόνα 1.1). Η διαλυτή μορφή της χημοκίνης απελευθερώνεται, πιθανώς μετά από πρωτεόλυση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης από ένα ένζυμο γνωστό σαν TNF-α μετατροπικό ένζυμο (converting enzyme). Η διαλυτή FKN αποτελεί έναν ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα για τα μονοκύτταρα και τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα (Bazan JF et al, 1997). Ο υποδοχέας της FKN (CX3CR1) αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές, είναι συζευγμένος με G-πρωτεΐνη και έχει υψηλή συγγένεια για την FKN, τον ένα και μοναδικό προσδέτη του, και η ενεργοποίησή του κινητοποιεί κυτταρικούς μηχανισμούς που προάγουν την χημειοταξία αλλά και την πρόσδεση στα κύτταρα που εκφράζουν FKN πρωτεΐνη (Imai T et al, 1997). Η αλληλεπίδραση χημοκίνης/υποδοχέα ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά μονοπάτια και μεσολαβεί άμεσα στην προσκόλληση και μετανάστευση των μονοκυττάρων (εικόνα 1.2.). Ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό των περισσότερων υποδοχέων χημοκινών είναι η υψηλή συγγένειά τους για περισσότερους εκ του ενός προσδέτες της ίδιας υπο-οικογένειας, σε αντίθεση με τον υποδοχέα της FKN. Η αλληλεπίδραση χημοκίνης-υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων οδηγεί στην παραγωγή ενδοκυτταρικού σήματος μέσω της G-πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα τον χημειοτακτισμό του κυττάρου προς την πηγή της χημοκίνης (Zlotnik P, 2001), (Apostolakis S et al, 2006).



**Εικόνα 1.1.** Σχηματική απεικόνιση του μορίου της fractalkine (FKN) ή CX3CL1. Αποτελείται από μια εξωκυττάρια περιοχή 76 αμινοξέων συζευγμένη με έναν εκτεταμένο κολλώδη μίσχο, που ακολουθείται από την διαμεμβρανική και την ενδοκυτταρική περιοχή 34 αμινοξέων.



**Εικόνα 1.2.** Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης χημοκίνης-υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου στόχου. Οι υποδοχείς των χημοκινών αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές και είναι συζευγμένοι με πρωτεΐνη-G. Η αλληλεπίδραση χημοκίνης υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων οδηγεί στην παραγωγή ενδοκυτταρικού σήματος μέσω της G-πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα τον χημειοτακτισμό του κυττάρου προς την πηγή της χημοκίνης.

Μέσω των μοναδικών δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων της, η FKN, κατέχει χαρακτηριστικά τόσο χημοκίνης όσο και μορίου προσκόλλησης (Bazan JF et al, 1997), (Imai T et al, 1997). Είναι συνεπώς ιδανική υποψήφιος για έναν ρυθμιστικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Η αλληλεπίδραση της FKN με τον υποδοχέα της *CX3CR1* αποτελεί βιοχημικό μονοπάτι με σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στον έσω χιτώνα του αγγείου.

Πράγματι, η FKN και ο υποδοχέας της *CX3CR1* έχουν εμπλακεί στην αθηρογένεση από πολλές μελέτες σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την έκφραση της χημοκίνης στα μονοκύτταρα/μακρόφαγα, τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα σε αθηρωματικές βλάβες ανθρώπινων στεφανιαίων αρτηριών (Wong BW et al, 2002). Οι Lucas και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs) στο μέσο χιτώνα αθηρωματικών αγγείων εκφράζουν *CX3CR1*. Επιπλέον έδειξαν ότι SMCs μεταναστεύουν προς ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινων στεφανιαίων αρτηριών που εκφράζουν FKN και προτείνουν ότι μέσω της αλληλεπίδρασης FKN/*CX3CR1* επάγεται η μετανάστευση των SMCs στις αθηρωματικές πλάκες (Lucas AD et al, 2003). Οι Combadiere και συνεργάτες μελέτησαν τον ρόλο της FKN στην αθηρογένεση σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια (*ApoE* *-/-*, *CX3CR1* *-/-*), και έδειξαν μια σημαντική μείωση στο μέγεθος των αθηρωματικών βλαβών σε ζώα που στερούνται τον υποδοχέα της FKN και κατ' επέκταση των βιοχημικών μηχανισμών που επάγονται από την αλληλεπίδραση FKN/*CX3CR1* (Combadiere C et al, 2003). Πρόσφατες μελέτες έχουν εμπλέξει την FKN στην συσσώρευση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Οι Schafer και συνεργάτες, απέδειξαν ότι αιμοπετάλια από αρουραίους, που είχαν προεπωαστεί με FKN, είχαν αυξημένη επιφανειακή έκφραση π-σελεκτίνης. Επίσης, η προεπάωση των αιμοπεταλίων με FKN ενίσχυσε την ικανότητα προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε ίνες κολλαγόνου και ινωδογόνου (Schafer A et al, 2004).

Αυτή η ουσιαστική συμμετοχή των χημειοτακτικών κυτοκινών στην εγκατάσταση και πρόοδο των αθηρωματικών βλαβών, έχει ενισχύσει τα τελευταία χρόνια την άποψη ότι οι χημοκίνες και οι υποδοχείς τους θα μπορούσαν να αποτελέσουν διαγνωστικούς ή προγνωστικούς δείκτες αλλά και νέους θεραπευτικούς στόχους στην αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης και των επιπλοκών της, όπως η στεφανιαία νόσος, η περιφερική αρτηριοπάθεια και η ισχαιμική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος.

### **1.2.2. Πολυμορφισμοί στο σύστημα χημοκινών του υποδοχέα CX3CR1 της FKN.**

Η αθηροσκλήρωση, όπως αναφέρθηκε, είναι φλεγμονώδης διαδικασία και ως τέτοια προϋποθέτει την παρουσία διαμεσολαβητών φλεγμονής, όπως οι χημοκίνες (Στεφανιάδης Χ, 2005), (Wilson PW, 1994). Αναμένεται ότι γενετικές παραλλαγές που επηρεάζουν τη δραστηριότητα του συστήματος των χημοκινών είναι επίσης ισχυροί υποψήφιοι ρυθμιστές της γενετικής προδιάθεσης σε αγγειοεγκεφαλικά ή στεφανιαία σύνδρομα, αν και υπάρχουν περιορισμένες μελέτες για τα αγγειοεγκεφαλικά επεισόδια, επηρεάζοντας την ένταση της φλεγμονώδους απάντησης στην ενδοθηλιακή βλάβη και κατ' επέκταση την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.

Η FKN αποτελεί το μοναδικό μέλος της οικογένειας των CX3C χημοκινών και είναι ισχυρός χημειοτακτικός παράγοντας μονοκυττάρων και ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων (Lucas AD et al, 2003). Δύο μη συνώνυμοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο του CX3CR1 που οδηγούν στην αντικατάσταση βαλίνης από ισολευκίνη στην θέση 249 και θρεονίνης από μεθειονίνη στην θέση 280 της πολυπεπτιδικής αλυσού της πρωτεΐνης. Έχει προταθεί ότι και οι δύο πολυμορφισμοί μειώνουν τη συγγένεια χημοκίνης/υποδοχέα, με συνέπεια μειωμένη δραστηριότητα των βιοχημικών λειτουργιών που επάγονται από την αλληλεπίδραση FKN/CX3CR1. Έχει περιγραφεί πλήρης ανισοκατανομή σύνδεσης



(linkage disequilibrium) μεταξύ των δύο πολυμορφισμών (Schafer A et al, 2004), (Takeya M et al, 1993).

Σκοπός της μελέτης μας είναι να δώσουμε νέα δεδομένα του ρόλου των πολυμορφισμών του *CX3CR1* υποδοχέα στα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια. Κάναμε γονοτυπική ανάλυση σε μια ομάδα ασθενών με γνωστή αθηρωματική βλάβη των καρωτίδων και σε μια ομάδα (όμοια σε ηλικία) υγιών μαρτύρων. Επίσης συγκρίναμε τα γονοτυπικά δεδομένα σε σχέση με το ιστορικό των ασθενών για ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ και με τους παράγοντες κινδύνου για εγκεφαλοαγγειακά επεισόδια.

## **2. Υλικά και μέθοδοι**

### **2.1. Συλλογή δειγμάτων**

Χρησιμοποιήθηκε μια ομάδα ασθενών και μια ομάδα μαρτύρων. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από την Γ΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του Νοσοκομείου Αθηνών <<Σωτηρία>> κατά την διάρκεια ενός έτους (Σεπτέμβριος 2003-Αύγουστος 2004). Στην μελέτη μας συμπεριλήφθηκαν 150 ασθενείς με στένωση των καρωτίδων και 151 υγιείς μάρτυρες. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε υπέρηχο καρωτίδων αν δεν είχαν κάνει το τελευταίο εξάμηνο. Οι ασθενείς με ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ/ΤΙΑ υποβλήθηκαν σε υπέρηχο καρωτίδων στα πλαίσια του βασικού εργαστηριακού ελέγχου κατά την νοσηλεία τους.

Η καρωτιδική στένωση καθορίστηκε με βάση τα καθορισμένα κριτήρια (Suwanvela N. et al, 1996), δηλαδή στένωση > 50% παρουσία συμπτωμάτων ή στένωση > 70% σε ασυμπτωματικούς ασθενείς (Rothwell PM et al, 2003), (Biller J et al, 1998). Οι ασθενείς συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μας με βάση τα παρακάτω κριτήρια.

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη αποτέλεσαν:

- 1) Ιστορικό για καρκίνο (εγκεφαλική μετάσταση).
- 2) Διάγνωση υπαραχνοειδούς αιμορραγίας.

3) Κολπική μαρμαρυγή

4) Αν είχαν υποβληθεί σε καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή.

Δεδομένου ότι η ηλικία είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για αθηρωμάτωση, η ομάδα ελέγχου αντιστοιχήθηκε με την ομάδα των ασθενών ως προς αυτόν τον παράγοντα, μέσο όρο ηλικίας τα 76 έτη. Δημογραφικά χαρακτηριστικά, παράγοντες κινδύνου για αγγειοεγκεφαλικά επεισόδια όπως κάπνισμα, υπέρταση, ΣΔ, δυσλιπιδαιμία, ιστορικό για προηγούμενα ΑΕΕ/ΤΙΑ, ιστορικό για καρδιαγγειακές παθήσεις και άλλες παράμετροι όπως η πρόληψη με ασπιρίνη ή άλλα αντιθρομβωτικά καταγράφηκαν και για τις δύο ομάδες ελέγχου.

Έγινε κατάταξη των ΑΕΕ βάση του TOAST διαγνωστικού συστήματος, στηριζόμενη στα κλινικά, εργαστηριακά και απεικονιστικά δεδομένα, σύμφωνα με την AT (αξονική τομογραφία) που έγινε εντός του 24ώρου και την επιβεβαιωτική εντός των 72ωρών, όπως και συμπληρωματικά MRI (μαγνητική τομογραφία) όπου κρίθηκε απαραίτητο, (Adams HP et al, 1993).

Οι παράγοντες κινδύνου καθορίστηκαν σύμφωνα με τους καθορισμένους προσδιορισμούς (De Backer et al, 2004). Καπνιστές χαρακτηρίστηκαν ασθενείς ή μάρτυρες που έκαναν συστηματική χρήση καπνού, είτε κατά την διάρκεια της μελέτης είτε στο παρελθόν. Διαβητικοί χαρακτηρίστηκαν ασθενείς με επίπεδα γλυκόζης ορού νηστείας μεγαλύτερα από 126 mg/dL, ή ασθενείς ήδη ευρισκόμενη υπό διαιτητική προσαρμογή ή υπό φαρμακευτική υπογλυκαιμική αγωγή. Συστηματική υπέρταση ορίστηκε η συστολική αρτηριακή πίεση αίματος μεγαλύτερη από 140 mmHg ή/και η διαστολική πίεση μεγαλύτερη από 90 mmHg σε τουλάχιστον τρεις μετρήσεις ή εάν μια τέτοια διάγνωση είχε τεκμηριωθεί στο παρελθόν και ο ασθενής θεραπευόταν με φάρμακα ή τροποποίηση του τρόπου ζωής. Για να ορίσουμε τη δυσλιπιδαιμία στην ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε τα φυσιολογικά επίπεδα για τον γενικό πληθυσμό (ολική χοληστερόλη (TC) νηστείας μεγαλύτερη από 240 mg/dL, ή επίπεδα

λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) μεγαλύτερα από 160 mg/dl, ή επίπεδα λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) χαμηλότερα από 35 mg/dl, ή αγωγή με υπολιπιδαιμικό παράγοντα. Τα βασικά κλινικοεργαστηριακά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη μας φαίνονται στον πίνακα 2.1.

**Πίνακας 2.1.** Κλινικά και επιδημιολογικά στοιχεία ασθενών και ομάδας ελέγχου. Από το δημοσιευμένο paper Kimouli et al, 2009.

---

<b>Carotid atheromatosis: (N=150)</b>	<b>Controls (N=151)</b>	<b>p-value</b>
---	-----------------------------	----------------

---

<b>Mean age (SD)</b>	76.4 (9.4)	76.7 (9.6)	NS
			<0.001
			0.029
<b>Large Vessel disease</b>	64 (61)	9 (11.3)	
<b>Small vessel disease</b>	20 (19)	34 (42.5)	
<b>TIA</b>	9 (8.6)	18 (22.5)	
<b>Undetermined etiology</b>	12 (11.4)	19 (23.8)	
<b>Previous ischemic events</b>			
<b>None</b>	89 (59.3)	104 (68.9)	
<b>One</b>	23 (15.4)		

		20 (13.2)
<b>Multiple</b>	38 (25.3)	

<sup>1</sup>Presence of one of the following: pharmacological treatment, total serum cholesterol > 6.2 mmol/L, LDL-cholesterol > 4.1 mmol/L.

<sup>2</sup>According to the TOAST classification. Cardioembolic and strokes of other determined etiology were excluded from the study and TIA were analysed separately.  
CI=Confidence Intervals; NS=Non-significant

## **2.2. Επεξεργασία δειγμάτων – Μέθοδοι**

Απομόνωση του γενομικού DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια, καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα.

Η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA αξιολογήθηκε φωτομετρικά με την απορρόφηση του δείγματος στα 260 και τον λόγο απορρόφησης στα 260/280 nm αντίστοιχα.

Ο γονοτυπικός έλεγχος για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς εκτελέστηκε αρχικά με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Το DNA

επώαστηκε σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία θερμοανθεκτικού ενζύμου (Taq DNA πολυμεράσης), μίγματος δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και κατάλληλου ζεύγους εκκινητών (primers) που πλαισιώνουν την πολυμορφική περιοχή. Τα αντιδραστήρια, οι συγκεντρώσεις τους αλλά και οι ποσότητες τους που χρησιμοποιήθηκαν για μία PCR αντίδραση φαίνονται στον πίνακα 2.2. Αρχικά το DNA αποδιατάσσεται θερμικά στους 95°C και ακολουθούν 30-40 κύκλοι με διαδοχική επώαση του διαλύματος στους 95°C (αποδιάταξη), 50-60°C (υβριδισμός των εκκινητών) και 72°C (πολυμερισμός). Οι αλληλουχίες των primers, οι συνθήκες για κάθε PCR αντίδραση και το μέγεθος των προϊόντων περιγράφονται συνοπτικά στον πίνακα 2.3.

**Πίνακας 2.2.** Συγκεντώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

PCR reagent	Volume
ddH <sub>2</sub> O	15,88μl

Buffer 10x	2,5µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5µl
Primers	1,5µl
dNTPs 10x	2,5µl
Taq Polymerase	0,12µl

**Πίνακας 2.3.** Αλληλουχία εκκινητών, συνθήκες PCR- RLFP, περιοριστικά ένζυμα.

---

**PCR**

**Primer sequence**

**Conditions**

**Product size (bp)**



TCCTTCAGGAAATCT

94°C 3 min

588

---

R-TCAGCATCAGGTTTCAGGAACTC

---

94°C 30 sec	35 cycles
52°C 40 sec	
72°C 55 sec	
72°C 10 min	

**RFLP**

**Polymorphism**

**Endonuclease**

**Wild-type**

**Mutant**

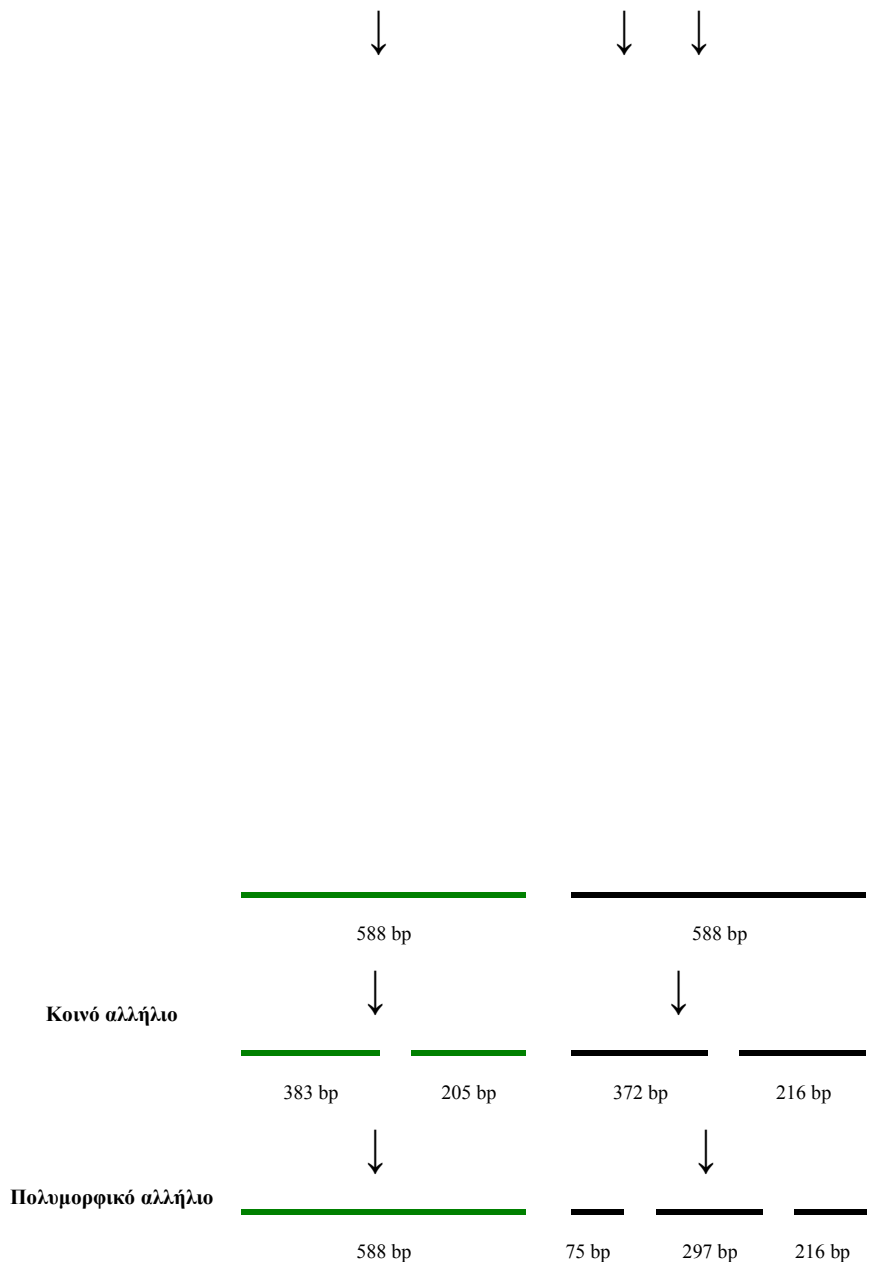
T280M *Bsmbl* 55°C for 3 hours 75, 216, 297 216, 372

V249I *AclI* 37° C for 3 hours 383, 205 588

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών CX3CR1-T280M και CX3CR1-V249I εφαρμόστηκε ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP analysis). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται πέψη των δίκλωνων πολυνουκλεοτιδικών των PCR προϊόντων με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες (restriction enzymes) (πίνακας 2.3). Τα ένζυμα δρουν ή όχι στην νουκλεοτιδική αλληλουχία ανάλογα με την παρουσία ή απουσία της πολυμορφικής περιοχής. Ο τρόπος δράσης των περιοριστικών ενζύμων στους υπό μελέτη πολυμορφισμούς συνοψίζεται στην εικόνα 2.1.

**Εικόνα 2.1.** Σχηματική απεικόνιση της ανάλυσης RFLP στους υπό μελέτη πολυμορφισμούς

	CX3CR1 V249I	CX3CR1 T280M
Ενδονουκλεάση	<i>AclI</i>	<i>BsmBI</i>



Τα PCR προϊόντα και τα προϊόντα της PCR-RFLP ανάλυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτώματα αγαρόζης σε υδατικό μέσο με ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE (0.09 Tris-HCl, 0.09 M Βορικό οξύ, 2.5 mM EDTA, pH 8.3). Η χρώση του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA έγιναν ορατές με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

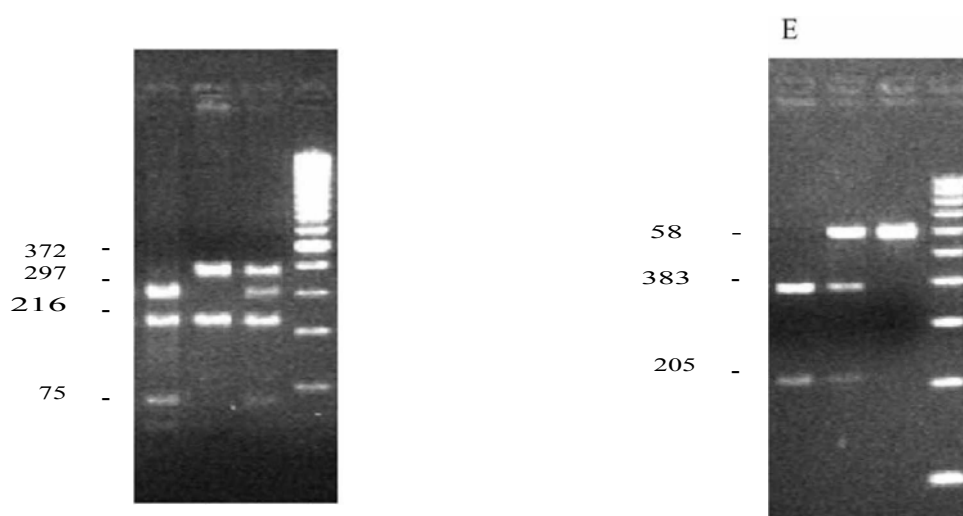
### **2.3 Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS for windows (έκδοση 12.0.1), καθώς και του προγράμματος Microsoft Office Excel 2003 σε Η/Υ. Το  $\chi^2$  τεστ χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και τον έλεγχο ώστε να ικανοποιούν την κατανομή Hardy–Weinberg. Το μοντέλο αυτό δηλώνει ότι υπάρχει προβλεπόμενη σχέση μεταξύ συχνότητας αλληλομόρφων και συχνότητας γονότυπου σε μια θέση χρωμοσώματος. Για να εκτιμηθεί η έκταση της επίδρασης κάθε γονοτύπου στην πιθανότητα εκδήλωσης αθηρωματικής νόσου, τα πηλικά διαγώνιων γινομένων (odds ratios) και τα διαστήματα αξιοπιστίας 95% (CIs) υπολογίστηκαν με την εφαρμογή ανάλυσης πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης (multiple logistic regression). Για να εξαχθούν χωριστές τιμές OR για κάθε γονότυπο, ο πιο κοινός γονότυπος θεωρήθηκε ως ομάδα αναφοράς. Η επίδραση των κλασσικών παραγόντων κινδύνου στην εκδήλωση αθηρωματικής νόσου υπολογίστηκε με τη ενσωμάτωση των παραμέτρων αυτών σε μία δεύτερη σειρά ανάλυσης πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης. Η ανεξάρτητη επίδραση των αλληλόμορφων I249 και M280 στην εκδήλωση AEE υπολογίστηκε περαιτέρω με τη ενσωμάτωση των μεταβλητών αυτών και των συμβατικών παραγόντων κινδύνου σε μια ανάλυση πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης. Το μέγεθος του δείγματος μας εξασφάλισε στατιστική ισχύ (power) 80% για ανίχνευση αύξησης 2.0 μονάδων του OR υποθέτοντας συχνότητα 20% του σπάνιου αλληλόμορφου στην ομάδα ελέγχου και για τιμή κριτηρίου  $p=0.05$ . Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμές Mann Whitney U test,  $\chi^2$  test Kruskal-Wallis H test και Kolmogorov-Smirnov test για την ανάλυση των συχνοτήτων, των φαινοτύπων και των κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων.

### **3. Αποτελέσματα**

Η συχνότητα των πολυμορφισμών *CX3CR1-T280M* και *CX3CR1-V249I* αναλύθηκε σε 150 ασθενείς με κλινικής σημασίας αθηρωματική νόσο των καρωτίδων και σε 151 αντίστοιχους σε ηλικία υγιείς μάρτυρες. Ο γονοτυπικός έλεγχος εκτελέστηκε με PCR σε συνδυασμό με RFLP ανάλυση (εικόνα 3.1). Οι συχνότητες των γονότυπων και οι συχνότητες των αλληλόμορφων για τους πολυμορφισμούς παρουσίασαν κατανομή σύμφωνη με την κατανομή Hardy-Weinberg (πίνακας 3.1), τόσο στην ομάδα ασθενών όσο και στην ομάδα ελέγχου.

**Εικόνα 3.1.** Ενδεικτικά PCR/RFLP προϊόντα για τους πολυμορφισμούς: α. *CX3CR1-T280M*, T/T (1), M/M (2), T/M (3) β. *CX3CR1-V249I*, V/V (1), V/I (2), I/I (3).



**Πίνακας 3.1.** Οι γονοτυπικοί συνδιασμοί στο σύνολο των ατόμων της μελέτης μας (301 άτομα). Από το δημοσιευμένο paper Kimouli et al, 2009.

	<b>T280M status</b>	
--	---------------------	--

	280T/T	280T/M	280M/M	
249V/I	58	64	1	p<0.001
249I/I	2	11	10	

Για να εκτιμηθεί η επίδραση του κάθε γονοτύπου στον κίνδυνο εκδήλωσης αθηρωμάτωσης των καρωτίδων εφαρμόσαμε ανάλυση πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης (multiple logistic regression). Τα πηλικά διαγωνίων γινομένων για κάθε γονότυπο προσαρμόστηκαν για τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου. Η συχνότητα των αλληλόμορφων και των γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς του υποδοχέα *CX3CR1* της FKN καταγράφονται στον πίνακα 3.2.



**Πίνακας 3.2.** Η συχνότητα των αλληλόμορφων και των γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς του υποδοχέα *CX3CR1* της FKN. Από το δημοσιευμένο paper Kimouli et al, 2009.

---

**Odds Ratio  
(95% CI)**

**Polymorphism**

**Carotid  
atheromatosis  
N=150 (%)**

**Controls  
N=151 (%)**

---

I/I

9 (6)

14 (9.3)

0.57 (0.23-1.4)

I249 carriers	68 (45.3)	78 (51.7)	0.64 (0.35-1.18) <sup>1</sup>
V allele frequency	0.74	0.7	1
I allele frequency	0.26	0.3	0.71 (0.58-1.09) <sup>1</sup>

<sup>1</sup>adjusted for age, gender, smoking status, diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia, use of statin and aspirin

Μετά από προσαρμογή για τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου, η σύγκριση της ομάδας με κλινική σημασία αθηρωματικής νόσου των καρωτίδων με την ομάδα ελέγχου για τον πολυμορφισμό T280M στο γονίδιο *CX3CR1* αποκάλυψε μια υπεροχή της συχνότητας του 280M μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στην ομάδα ελέγχου (0.15 versus 0.23, adjusted Odds Ratio 0.47, 95% Confidence Intervals 0.30-0.74;  $p=0.008$ ). Τα Odds Ratio για αθηρωμάτωση των καρωτίδων ανάμεσα σε αυτούς που έφεραν το M280 αλληλόμορφο ήταν 0.34 (95% CI 0.20-0.60;  $p<0.001$ ), αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό. Για το σύνολο των ασθενών η συχνότητα του M280 αλληλόμορφου ήταν 25,3% (38) ενώ για το σύνολο των μαρτύρων 42,4% (64). Δηλαδή προκύπτει ισχυρή συσχέτιση για τους M280-περιέχοντες γονοτύπους (TM+MM), χρησιμοποιώντας ως βασικό κίνδυνο τον ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο γονότυπο (T/T), μετά από προσαρμογή του αποτελέσματος για τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου (ηλικία, φύλο, κάπνισμα, ΣΔ, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, χρήση στατινών και ασπιρίνης).

Επίσης η συχνότητα της εμφάνισης του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου I249 ήταν συχνότερη στην ομάδα των μαρτύρων σε σχέση με τους ασθενείς αλλά χωρίς ιδιαίτερη στατιστική σημασία. Η συχνότητα του I249 αλληλόμορφου ήταν 45,3% (68) για τους ασθενείς και 51,7% (78) για τους μάρτυρες (πίνακας 3.2). Ενώ και οι δύο κοινές παραλλαγές του γονιδίου φαίνεται να επηρεάζουν την λειτουργικότητα του υποδοχέα, η πλήρης ανισορροπία σύνδεσης των δύο θέσεων καθιστά δύσκολη την διάκριση της ανεξάρτητης συμβολής κάθε πολυμορφισμού στον κίνδυνο για αθηρωμάτωση. Παρά την παρατηρηθείσα υπεροχή του M280 στην ομάδα ελέγχου, παρόμοια στατιστικά σημαντική υπεροχή δεν επιβεβαιώθηκε για το I249 αλληλόμορφο.

Η ανάλυση πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης των δύο πολυμορφισμών V249I και T280M και των παραγόντων κινδύνου, έδειξε ότι η απουσία του M280 αλληλόμορφου ήταν ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου για αθηρωμάτωση των καρωτίδων (OR 3.70, 95% CI 1.92-7.14;  $p=0.001$ ), αποτέλεσμα μεγάλης στατιστικής

σημασίας. Δηλαδή υπάρχει 4 φορές μεγαλύτερος κίνδυνος για αθηρωμάτωση των καρωτίδων σε απουσία του M280 αλληλόμορφου. Αυτός ο παράγοντας κινδύνου όπως φαίνεται από τον πίνακα 3.3 είναι ο ισχυρότερος και ανεξάρτητος από τους γνωστούς ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για αθηρωμάτωση (ηλικία, φύλο, κάπνισμα, ΣΔ, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία).

**Πίνακας 3.3.** Ανάλυση πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης των παραγόντων κινδύνου για αθηρωμάτωση των καρωτίδων. Από το δημοσιευμένο paper Kimouli et al, 2009.

**Correlation Coefficient**

**(95% CI)**

---

<b>Age</b>	1.02 (0.99-1.04)
------------	------------------

---

---

**Male Sex**

1.58 (0.93-2.70)

**Cigarette smoking**

2.29 (1.34-3.92)

---

Μελετήθηκε επίσης μια ομάδα 185 ασθενών με ΑΕΕ ή παροδικό ΑΕΕ/ΤΙΑ όπως φαίνεται στον πίνακα 3.4. Από την ανάλυση πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης των δύο πολυμορφισμών V249I και T280M, δε βρέθηκε καμία συσχέτιση με αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια δεδομένου ότι η παρουσία αθηρωμάτωσης των καρωτίδων (OR 1.42, 95% CI 1.30-1.56), το ιστορικό για προηγούμενο ισχαιμικό σύμβαμα (OR 6.27, 95% CI 3.3-11.92), η ηλικία (OR 1.04, 95% CI 1.01-1.07), η υπέρταση (OR 1.39, 95% CI 1.29-1.50), ο ΣΔ (OR 1.1, 95% CI 1.02-1.21), η δυσλιπιδαιμία (OR 2.21, 95% CI 1.24-3.93) και το κάπνισμα (OR 1.31, 95% CI 1.22-1.37) ήταν όλοι παράγοντες ανεξάρτητοι με την εισαγωγή για ΑΕΕ/ΤΙΑ. Τα ίδια αποτελέσματα πήραμε ακόμη και όταν οι 73 ασθενείς με ΑΕΕ λόγω προβλήματος των μεγάλων αγγείων αναλύθηκαν χωριστά.

**Πίνακας 3.4.** Από το δημοσιευμένο paper Kimouli et al, 2009.

---

<b>Carotid atheromatosis</b>	<b>Controls</b>	<b>p-value</b>
----------------------------------	-----------------	----------------

---

---

<b>Admission due to stroke/TIA</b>	105 (70)	80 (53)	0.002
------------------------------------	----------	---------	-------

<b>Large Vessel disease</b>	64 (61)	9 (11.3)
<b>Small vessel disease</b>	20 (19)	34 (42.5)
<b>TIA</b>	9 (8.6)	18 (22.5)
<b>Undetermined etiology</b>	12 (11.4)	19 (23.8)



---

<sup>1</sup>According to the TOAST classification. Cardioembolic and strokes of other determined etiology were excluded from the study and TIA were analysed separately.

φλεγμονώδη απάντηση και έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια ενός μεγάλου αριθμού λοιμωδών και φλεγμονωδών νόσων, όπως, της λοίμωξης από τον ιό της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1), της βρογχιολίτιδας από αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), του βρογχικού άσθματος, της σαρκοείδωσης, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της σπειραματονεφρίτιδας, των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, της σκλήρυνσης κατά πλάκας, και της αθηροσκλήρωσης (Zlotnik P, 2001), (Apostolakis S et al, 2006). Βάση αυτής της θεωρίας καταλαβαίνουμε την βαρύτητα της μελέτης αυτής που ήρθε να προσδώσει νέα δεδομένα για αυτούς τους μηχανισμούς.

Μελετήσαμε την συχνότητα των δύο πολυμορφισμών του υποδοχέα της FKN σε 150 ασθενείς με τεκμηριωμένη κλινικής σημασίας αθηρωμάτωση των καρωτίδων και σε 151 μάρτυρες με φυσιολογικά αγγεία. Τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης δείχνουν μια χαμηλότερη συχνότητα του μεταλλαγμένου M280 αλληλόμορφου στην ομάδα των ασθενών έναντι της ομάδας ελέγχου, υγιείς μάρτυρες με αντιστοιχία στην ηλικία. Η συσχέτιση ανάμεσα στη συχνότητα του M280 αλληλόμορφου και της αθηρωμάτωσης των καρωτίδων ήταν ανεξάρτητη από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου για αγγειακή νόσο, και ήταν στατιστικά σημαντικής σημασίας. Επιπροσθέτως, η ανάλυση πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης για τον πολυμορφισμό T280M, έδειξε ότι η απουσία του M280 αλληλόμορφου ήταν ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου για αθηρωμάτωση των καρωτίδων (OR 3.70, 95% CI 1.92-7.14;  $p=0.001$ ). Δηλαδή υπάρχει 4 σχεδόν φορές μεγαλύτερος κίνδυνος για αθηρωμάτωση των καρωτίδων σε απουσία του M280 mutant αλληλόμορφου, αποτέλεσμα μεγάλης στατιστικής σημασίας. Αν και η παρατήρηση παραμένει στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας, δεν παύει να είναι ενδεικτική μιας αξιοσημείωτης επίδρασης ενός μεμονωμένου γενετικού πολυμορφισμού στην πιθανότητα εκδήλωσης μίας σύνθετης και πολυπαραγοντικής νόσου.

Αυτός ο παράγοντας κινδύνου είναι μεγαλύτερης επικινδυνότητας από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου όπως φαίνεται από την μελέτη μας. Το αποτέλεσμα είναι απόλυτα συμβατό με προηγούμενες παρατηρήσεις που συσχετίζουν την παρουσία του 280M αλληλόμορφου με δυσλειτουργία του FKN/CX3CR1 μονοπατιού και ενισχύει έμμεσα την θεωρία της συμμετοχής του τελευταίου στην εγκατάσταση και εξέλιξη των αθηρωματικών βλαβών.

Εν αντιθέσει, ο άλλος γνωστός πολυμορφισμός V249I του υποδοχέα CX3CR1 της FKN, που εξετάσαμε σε αυτή την μελέτη δεν έχει σημαντικά στατιστικό συσχετισμό με την αθηρωματική νόσο των καρωτίδων. Τα στοιχεία που παρέχονται στη σύγχρονη βιβλιογραφία, σχετικά με τον πιθανό αθηροπροστατευτικό ρόλο του αλληλόμορφου CX3CR1-I249 αποκλίνουν. Στην μελέτη που περιγράφηκε πρόσφατα από τους McDermott και συνεργάτες, απέτυχαν να τεκμηριώσουν οποιαδήποτε επίδραση του πολυμορφισμού V249I στον κίνδυνο εκδήλωσης ΣΝ (στεφανιαίας νόσου) (Mc Dermott DH et al, 2003), (Apostolakis S et al, 2007), ενώ άλλες ανεξάρτητες μελέτες τεκμηρίωσαν συσχέτιση του I249 αλληλομόρφου με μειωμένο κίνδυνο εκδήλωσης της (Moatti D et al, 2001), (Mc Dermott DH et al, 2003). Στην ίδια μελέτη απέδειξαν σε ένα *in vitro* μοντέλο ότι η πολυμορφική μορφή του υποδοχέα CX3CR1 δυσλειτουργεί ως προς την αλληλεπίδραση του με την FKN. Επίσης η επίδραση αυτής της δυσλειτουργίας εξετάστηκε σε μια γενετική επιδημιολογική μελέτη και συσχετίστηκε με σημαντικά χαμηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης ΣΝ (Mc Dermott DH et al, 2003). Η μελέτη μας είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα των McDermott και συνεργατών και επιβεβαιώνει την αθηροπροστατευτική επίδραση του M280 αλληλομόρφου.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής είναι σύμφωνα και με άλλες αν και περιορισμένες μελέτες που υπάρχουν στην βιβλιογραφία, όπου υπάρχει αντίστροφη σχέση ανάμεσα στο M280 και την αθηρωμάτωση των καρωτίδων (Ghilardi et al, 2004). Αν και έχει περιγραφεί πλήρης ανισοκατανομή σύνδεσης (linkage

disequilibrium) μεταξύ των δύο πολυμορφισμών T280M και V249I, ο ρόλος του δεύτερου δεν είναι τόσο ξεκάθαρος. Στην μελέτη μας δεν βρήκαμε συσχέτισμό αυτού του πολυμορφισμού V249I και της αθηρωματικής νόσου των καρωτίδων, κάτι το οποίο είναι σε αντιστοιχία με προηγούμενες μελέτες (Ghilardi et al, 2004), (Norata GD et al, 2006). Μόνο σε μια μελέτη η συχνότητα του 249I αλληλομόρφου συσχετιζόταν με τις αθηρωματικές πλάκες, όχι όμως με την κλινικής σημασίας αθηρωμάτωση των καρωτίδων (Ghilardi et al, 2004).

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις είναι ενδεικτικές μιας αθηροπροστατευτικής επίδραση του M280 αλληλόμορφου. Τα άτομα που φέρουν το M280 αλληλόμορφο σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση φαίνεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα στην αθηρωματική νόσο των καρωτίδων έναντι εκείνων με τον T/T γονότυπο.

Παρόλα αυτά, μια αντίθετη σχέση μεταξύ αυτού του αλληλόμορφου M280 και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, που φάνηκε από την δική μας έρευνα, δεν έχει παρατηρηθεί μέχρι τώρα στην βιβλιογραφία, εκτός από μια μοναδική μελέτη που έδειξε ότι οι ομόζυγοι που φέρουν το mutant αλληλόμορφο 280M ήταν υψηλού κινδύνου για αγγειακά ισχαιμικά επεισόδια (Lavergne et al, 2005), αν και άλλη μελέτη δε βρήκε αντίστοιχη συσχέτιση (Hattori H et al, 2005). Η μελέτη αυτή δε σχεδιάστηκε ειδικά να υποστηρίξει αυτήν την έκβαση αλλά παρατηρήσαμε ότι οι διάφοροι γονότυποι του υποδοχέα *CR3CR1* δεν σχετίζονται με ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια, σε αντίθεση με την σχέση που καταγράψαμε με την αθηρωμάτωση των καρωτίδων και τους περισσότερους προδιαθεσικούς παράγοντες για τη νόσο των αγγείων. Το ίδιο παρατηρήθηκε ακόμη και όταν μελετήθηκαν χωριστά οι ασθενείς με AEE με ισχαιμία των μεγάλων αγγείων και σχετική καρωτιδική στένωση. Τέτοια ανάλυση πρώτη φορά γίνεται σε μελέτη.

Το αντιφατικό αποτέλεσμα της επίπτωσης του 280M αλληλόμορφου ανάμεσα σε ασθενείς με AEE και σε ασθενείς με αθηρωμάτωση των καρωτίδων είναι δύσκολο να

εξηγηθεί, αφού υπάρχει και περιορισμός λόγω έλλειψης ανάλογων ερευνών. Εντούτοις, η ανεύρεση του χαμηλού σε αριθμό γονοτύπων για τα ομόζυγα M/M και I/I σε ασθενείς με κλινικής σημασίας αθηρωμάτωση των καρωτίδων υποδηλώνει ότι ρόλος του υποδοχέα *CX3CR1* της FKN στην διαδικασία της αθηρογένεσης είναι σημαντικός (Veillard NR et al, 2005) (Braumersreuther V et al, 2007). Από την άλλη, ενώ η αγγειακή αθηρωμάτωση οδηγεί σε ΑΕΕ, δεν παύει όμως να είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που πολλοί παράμετροι και παράγοντες κινδύνου ενοχοποιούνται (Kistler JP, 1996), με συνέπεια να μη μπορεί να φανεί εύκολα η επίπτωση των πολυμορφισμών του υποδοχέα *CX3CR1* σε μια ανάλυση πολλαπλής λογαριθμικής εξάρτησης. Αυτή η θεωρία ενισχύεται από το γεγονός ότι ο κίνδυνος για εγκεφαλική ισχαιμία που σχετίζεται με την μειωμένη συχνότητα των αλληλόμορφων του *CX3CR1* είναι πιο αξιοσημείωτος σε ασθενείς με ελεύθερο καρδιαγγειακό ιστορικό (Lavergne et al, 2005), αλλά υπάρχει περιορισμός στην ανάλυση αυτή λόγω του μικρού αριθμού των ομόζυγων ασθενών. Ο αθηροπροστατευτικός ρόλος του μεταλλαγμένου M280 ίσως παίζει νωρίς ρόλο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης που μέχρι αυτή να καταλήξει σε ΑΕΕ, γίνεται συνδυασμός πολλών γονιδίων, περιβαλλοντικών παραγόντων και παθολογικών καταστάσεων.

Από την άλλη πλευρά υπάρχουν πρόσφατα δεδομένα που δηλώνουν ότι η έλλειψη του *CX3CR1* έχει ευνοϊκή επιρροή στην εγκεφαλική βλάβη και φλεγμονή (Denes A et al, 2008), σε αντίθεση με άλλες μέχρι τώρα μελέτες (Lavergne et al, 2005), (Hattori H et al, 2005). Συμπερασματικά είναι φανερό ότι ο ακριβής ρόλος των πολυμορφισμών του υποδοχέα *CX3CR1* στην αθηρωμάτωση των καρωτίδων σε σχέση με την εξέλιξη σε αγγειακό εγκεφαλικό δεν έχει διευκρινιστεί και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.

Στην δική μας μελέτη δεν παύει να έχουμε κάποιους περιορισμούς. Υπάρχει ένα σφάλμα στην συλλογή του δείγματος, καθώς στους ασθενείς που δεν εισήχθησαν για

ΑΕΕ ο έλεγχος της λειτουργίας των καρωτίδων έγινε εθελοντικά. Σε αυτούς με ΑΕΕ ο έλεγχος ήταν στα πλαίσια του υποχρεωτικού ελέγχου. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα το δείγμα το ασθενών με καρωτιδική αθηρωμάτωση να ήταν ασθενείς που είχαν υποστεί και ΑΕΕ. Προσπάθεια στο να περιορίσουμε αυτό το σφάλμα έγινε με την αντιστοιχία που κάναμε για την ηλικία ανάμεσα στις δύο ομάδες ελέγχου, τους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες και την απόκλιση αυτών με αιμορραγικό ή καρδιοεμβολικό εγκεφαλικό. Επίσης εξετάσαμε χωριστά την συχνότητα των αλληλόμορφων του *CX3CR1* στους διάφορους υποτύπους εγκεφαλικού σε σχέση με την αθηρωμάτωση των καρωτίδων. Δεδομένα CT- αγγειογραφίας ή χειρουργικής παρέμβασης δεν συμπεριλαμβάνονται στην μελέτη αυτή, αφού δεν ήταν δυνατό να καταγραφούν για όλους τους ασθενείς και ειδικά για τους μάρτυρες. Το μέγεθος της καρωτιδικής βλάβης ορίστηκε βάση του Doppler. Δεν χρησιμοποιήθηκε διακρανιακό Doppler, με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να έχουμε εκτίμηση για την ενδοκρανιακή αθηροσκλήρωση, όπως επίσης και τα δεδομένα της CRP υψηλής ευαισθησίας, που θα μπορούσαν να μας αποδώσουν το βαθμό της φλεγμονής των αθηρωματικών πλακών.

Παρά τους περιορισμούς της μελέτης μας, προκύπτει ένα πολύ σημαντικό δεδομένο. Τα άτομα που φέρουν το M280 αλληλόμορφο σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση φαίνεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα για αθηρωμάτωση των καρωτίδων έναντι εκείνων με τον T/T γονότυπο. Η παρουσία του M280 αλληλόμορφου έχει μια αθηροπροστατευτική επίδραση. Κατά πόσο αυτό μεταφράζεται στο ότι μπορεί να έχει αποτέλεσμα στην επίπτωση των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση σε μεγάλο δείγμα ασθενών. Αν τεκμηριώσουμε αυτήν την υπόθεση και διευκρινίσουμε τους μηχανισμούς που εμπλέκονται, θα μπορέσουμε να έχουμε νέα δεδομένα για την παθογένεια των ΑΕΕ σε κλινικό, μοριακό αλλά κυρίως θεραπευτικό επίπεδο.

Το σημαντικό ερώτημα σε κάθε μελέτη γενετικής επιδημιολογίας είναι πώς οι πληροφορίες που προκύπτουν θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμες σε διαγνωστικό και θεραπευτικό επίπεδο. Πέρα από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου που έχουν προκύψει μέσα από ευρείας κλίμακας επιδημιολογικές παρατηρήσεις, η βασική έρευνα μπορεί να αναδείξει πολλούς υποψήφιους νέους δείκτες αθηρωματικής νόσου και των επιπλοκών της. Πολλοί εξ αυτών των παραγόντων είναι προφλεγμονώδη μόρια και αντικατοπτρίζουν την αυξημένη συστηματική φλεγμονώδη δραστηριότητα που λαμβάνει χώρα στο αγγειακό τοίχωμα. Τέτοιοι παράγοντες όπως η hs CRP έχουν ήδη βρει κλινική εφαρμογή στην συνολική εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου, ενώ άλλοι όπως η IL-6, και μόρια πρόσδεσης (ICAM, VCAM, selectins) βρίσκονται υπό αξιολόγηση (Παναγιωτάκος Π et al, 1994). Η τεχνική και θεωρητική πρόοδος των τελευταίων ετών στον χώρο της γενετικής έχει κάνει εφικτή την ταυτόχρονη μελέτη μεγάλου αριθμού γονιδίων για εντοπισμό πολυμορφισμών και μεταλλάξεων. Πιστεύουμε ότι σύντομα το γονιδιακό screening θα βρει κλινική εφαρμογή στην ανίχνευση ασθενών υψηλού αθηρωματικού κινδύνου και όποιας επιπλοκής. Η μεγάλη συχνότητα της παραλλαγής T280M και η ανεξάρτητη επίδραση της -όπως προκύπτει και από την παρούσα μελέτη- στην πιθανότητα εκδήλωσης αθηρωματικής νόσου θα μπορούσαν να συμβάλλουν -μαζί με άλλες γενετικές παραλλαγές- στην συνολική εκτίμηση του αγγειακού κινδύνου.

Με βάση τα συμπεράσματά μας και αποτελέσματα προερχόμενα και από παρόμοιες μελέτες υπάρχουν ενδεικτικά στοιχεία του ότι το μοριακό μονοπάτι FKN/CX3CR1 θα μπορούσε να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη και θεραπευτικό στόχο στην αντιμετώπιση των ισχαιμικών συμβάντων. Φυσικά, παρά τα πολλά υποσχόμενα δεδομένα από την παρούσα μελέτη και την σύγχρονη βιβλιογραφία, απαιτείται πολύ περαιτέρω έρευνα στον χώρο της ρύθμισης της έκφρασης των

χημοκινών και των υποδοχέων τους στους κυτταρικούς πληθυσμούς που εμπλέκονται στην αθηρογένεση, πριν όλη αυτή η πληροφορία βρει εφαρμογή στην κλινική πράξη.



## **5. Βιβλιογραφία**

- Adams HP et al (1993). **Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment.** Stroke; 24:35-41.

- Apostolakis S et al (2006). **Chemokines in vascular pathology**. *Int J Mol Med*; 17: 691-701.



- Moatti D et al (2001). **Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease.** Blood; 97: 1925–8.
  
- Norata GD et al (2006). **Effects of fractalkine receptor variants on common carotid artery intima-media thickness.** Stroke; 37:1558-1561.

