

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

« ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ
ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ »

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΙΝΤΡΟΝΙΟ 4 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ
ΙΣΟΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (eNOS) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ ΚΑΙ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ».

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΒΑΖΓΙΟΥΡΑΚΗΣ

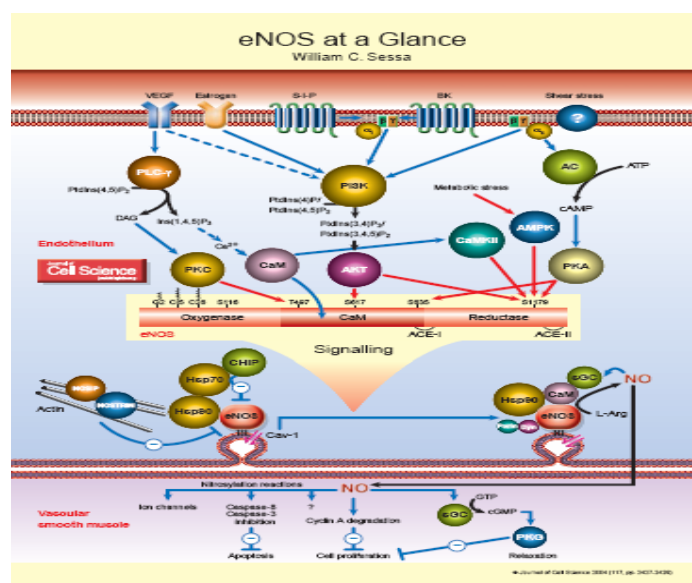
ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΟΥΜΠΑΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΓΟΥΛΙΕΛΜΟΣ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ



ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	
Abstract	
1. Εισαγωγή	1
1.1. Φυσιολογική δράση του Μονοξειδίου του Αζώτου (NO)	1
1.2. Ενδοθηλιακή Ισομορφή της Συνθετάσης του NO (eNOS)	2
1.3. Ο ρόλος της eNOS στην αθηρογένεση. Μελέτες σε ζώα με έλλειψη του γονιδίου eNOS	3
1.4. Η eNOS ως ένζυμο παραγωγής Υπεροξειδίου	3
1.5. Ρύθμιση του γονιδίου της eNOS	4
1.6. Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Σ.Ε.Λ.) και NO	6
1.7. Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (Ρ.Α.) και NO	6
1.8. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αγγειακές επιπλοκές	7
1.9. Γενετικοί πολυμορφισμοί της eNOS	7
1.10. Γενετικός Πολυμορφισμός στο Ιντρόνιο 4 του Γονιδίου της eNOS	8
1.11. Γενετικός Πολυμορφισμός στο Ιντρόνιο 4 του Γονιδίου της eNOS και Αυτοάνοσα Νοσήματα	9
1.12. Σημασία Επιλογής του Κρητικού Πληθυσμού για μελέτη Συσχέτισης πολυμορφισμών με Νόσο	10
2. Σκοπός της μελέτης	11
3. Ασθενείς και μέθοδοι	12
3.1. Ασθενείς-Υγιείς εθελοντές	12
3.2. Μέθοδοι	12
3.2.1. Υλικά	13
3.2.2. Εξοπλισμός	14
3.2.3. Διαδικασία	14
3.3. Στατιστική ανάλυση	19
4. Αποτελέσματα	20
4.1.Μελέτη ασθενών – μαρτύρων για το Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο	20
4.2.Μελέτη ασθενών – μαρτύρων για τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα	22
4.3.Συγκριτική μελέτη του πολυμορφισμού μεταξύ ασθενών με Σ.Ε.Λ. και Ρ.Α. Κρητικής καταγωγής	23
5. Συζήτηση	25
6. Βιβλιογραφικές αναφορές	31

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Σεπτεμβρίου 2005-Ιουλίου 2006, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Κυτταρική και Γενετική αιτιολογία, διαγνωστική και θεραπευτική των ασθενειών του ανθρώπου», για την απόκτηση μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης. Το πειραματικό κομμάτι της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Παθολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με συνεπιβλέποντες τον καθηγητή Παθολογίας, Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας κ. Δημήτριο Μπούμπα και το λέκτορα Γενετικής κ.Γεώργιο Γουλιέλμο.

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη αυτή, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υπεύθυνους του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Μπούμπα, Καθηγητή Παθολογίας και κ. Ζαννή, Καθηγητή Βιοχημείας για την ευκαιρία που μου έδωσαν να φοιτήσω στο πρόγραμμα και επιπλέον τον κ. Μπούμπα επιβλέποντα της παρούσας μελέτης, για την αποδοχή μου στο εργαστήριό του και την κατανόησή του. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να πω και στους συνεργάτες μου στα εργαστήρια Παθολογίας και Ρευματολογίας, καθώς και το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Ρευματολογικής κλινικής αλλά και του τμήματος αιμοδοσίας του ΠΑ.Γ.Ν.Η για την καλή συνεργασία και τη συνεισφορά τους στη συλλογή κλινικών πληροφοριών και δειγμάτων. Ιδιαίτερη αναφορά θα ήθελα να κάνω στον δεύτερο συνεπιβλέποντα της παρούσας εργασίας, κ. Γεώργιο Γουλιέλμο, ο οποίος από την αρχή με καθοδήγησε σωστά και με βοήθησε σημαντικά, όχι μόνο επιστημονικά αλλά και ηθικά σε όλα τα στάδια της παρούσας δουλειάς, βοηθώντας στην εξοικείωση μου με το δύσκολο αντικείμενο της μοριακής γενετικής. Τον ευχαριστώ θερμά. Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αδαμάκη, γραμματέα του μεταπτυχιακού προγράμματος για την διαρκή εγρήγορση και μέριμνα για την επίλυση τυχόν προβλημάτων.

Η παρούσα εργασία αφιερώνεται στους γονείς μου και την αδελφή μου για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια που μου παρείχαν.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO), a short-lived gaseous free radical, synthesized from L-arginine by NO synthases (NOS), has been characterized as a potent mediator of autoimmune and inflammatory responses, thus considered as an agent playing a key role in the pathogenesis of autoimmune diseases. Low concentrations of the intercellular messenger NO are important to endothelial function. Moreover, it directly inhibits platelet aggregation, may compromise coagulation, immune function, control of volume and electrolyte content of the intravascular and extravascular spaces. Most biological NO is produced by the family of three nitric oxide synthases (NOS). In systemic lupus erythematosus (SLE), endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*) gene locus has been found in genetic linkage with the disease; *eNOS* is produced in significant amounts and endothelial cell dysfunction has been observed. Similarly, several lines of evidence indicate that nitric oxide (NO) may be important in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). Upon now, several functionally relevant genetic polymorphisms in the *eNOS* gene have been associated with different vascular, infectious and autoimmune disease such as SLE and RA in some populations. The objective of this study was to investigate the influence of the *eNOS* gene intron 4 **a/b** VNTR polymorphism (a 27 base-pair tandem repeat based polymorphism) on susceptibility to SLE and RA in patients living in the island of Crete, a genetically homogeneous population. A group of 145 healthy subjects and 190 SLE patients were included in this study. Similarly, a second group of 235 healthy controls and 202 RA patients were analyzed. In both cases, patients and controls were sex and age matched. The present study, constituting the first attempt to assess the implication of *eNOS* gene intron 4 **a/b** polymorphism in susceptibility to SLE and RA in natives of Crete, which share a common genetic and cultural background, has been revealed that the presence of **a/b** genotype of the *eNOS* gene may act as a risk factor for the development of RA in island of Crete. In contrast, the same *eNOS* polymorphism seems to not be associated with susceptibility to SLE.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυσιολογική δράση του Μονοξειδίου του Αζώτου (NO)

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO), είναι ισχυρό ενδογενές αγγειοδιασταλτικό. Είναι ένα από τα πλέον σημαντικά βιολογικά μόρια, με δράση παρούσα σε όλα σχεδόν τα βιολογικά συστήματα. Δρα ως πυροδοτικό, διαμεσολαβητικό ή εκτελεστικό μόριο σε μια ποικιλία βιολογικών αντιδράσεων και μονοπατιών σηματοδότησης [1]. Συμμετέχει στις φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες αποκρίσεις καθώς επίσης και στην άμυνα του ξενιστή έναντι μικροβίων και καρκινικών κυττάρων [2]. Οι δράσεις του επιτελούνται είτε άμεσα μέσω αντιδράσεων μεταξύ NO και συγκεκριμένων βιομορίων, είτε έμμεσα μέσω ενεργών ριζών νιτρώδους που παράγονται ως προϊόντα οξειδωσης [3].

Η σύνθεση του NO ρυθμίζεται αυστηρά από τις συνθετάσες του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide Synthases, NOS), οι οποίες εμφανίζονται σε τρεις ισομορφές: τη νευρωνική (nNOS), την επαγόμενη (iNOS) και την ενδοθηλιακή ισομορφή (eNOS). Και οι τρεις ισομορφές των παραπάνω συνθετασών λειτουργούν ως ομοδιμερή, στα οποία οι αμινοτελικές περιοχές δύο μορίων που έχουν δράση οξυγενάσης, ενώνονται μεταξύ τους [4].

Το μονοξείδιο του αζώτου που παράγεται από το ενδοθήλιο, θεωρείται το σημαντικότερο μόριο διατήρησης της ενδοθηλιακής ομοιόστασης και επίκτητες διαταραχές στη σύνθεση του NO που σχετίζονται με καρδιαγγειακούς κινδύνους προκαλούν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης [5], [6].

Καθώς η ρύθμιση της διαθεσιμότητας του NO στο ενδοθήλιο παρέχεται στο επίπεδο του συνθετικού του ενζύμου, της eNOS, το γονίδιο που κωδικοποιεί την eNOS αποτελεί ένα υποψήφιο γονίδιο προδιάθεσης για ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης [7]. Ελάττωση στη βασική παραγωγή του NO λόγω μεταβολών στην παραγωγή ή λειτουργικότητα του βιοσυνθετικού ενζύμου της eNOS μπορεί να αποτελέσει την απαρχή ή να συμβάλλει στην εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας [8].

1.2. Ενδοθηλιακή Ισομορφή της Συνθετάσης του NO (eNOS)

Η Ενδοθηλιακή Ισομορφή της Συνθετάσης του NO (eNOS), αποτελεί μια πρωτεΐνη μεγέθους 135kDa, η οποία κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 7q35-36. Το γονίδιο της αποτελείται από 26 εξόνια και 25 ιντρόνια και καταλαμβάνει μια γενωμική περιοχή περίπου 21kb [9]. Η πρωτεΐνη εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε χαμηλά επίπεδα στα αιμοπετάλια [10]. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα η eNOS παράγει συνεχώς NO σε χαμηλά επίπεδα. Το NO που παράγεται από την eNOS στα ενδοθηλιακά κύτταρα θεωρείται ότι συμβάλλει ουσιαστικά στη διατήρηση της ενδοθηλιακής ομοιόστασης καθώς αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων του τοιχώματος των αγγείων και αποτρέπει την προσκόλληση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα [11]. Έτσι μέσω των αντιφλεγμονωδών και αγγειοδιασταλτικών του ιδιοτήτων, το προερχόμενο από την eNOS, NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα, διατηρεί την ακεραιότητα του αγγειακού ενδοθηλίου και φαίνεται να προστατεύει από καρδιαγγειακές και νεφρικές επιπλοκές οι οποίες συχνά συνοδεύουν την εξέλιξη των αυτοάνοσων νοσημάτων. Απώλεια της δραστηριότητας της eNOS, προδιαθέτει στην εμφάνιση ενδαγγειακής θρόμβωσης, στην ενεργοποίηση και προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο αγγειακό τοίχωμα και στη διαπύδυσή τους στο μέσο χιτώνα, καταστάσεις που αποτελούν το εναρκτήριο βήμα ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης [12].

Πειραματικές και κλινικές μελέτες παρέχουν ενδείξεις ότι διαταραχές στη δράση του ενδοθηλιακού NO (που συνολικά αναφέρεται ως ενδοθηλιακή δυσλειτουργία), δε σχετίζονται μόνο με όλους τους μείζονες καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου όπως η υπερλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση και το κάπνισμα αλλά έχουν και μια φανερό προγνωστική αξία για τη μελλοντική εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας [13]-[17]. Επομένως το δυσλειτουργικό eNOS/NO μονοπάτι, θεωρείται ως πρώιμος δείκτης ή ένας κοινός μηχανισμός για διάφορες καρδιαγγειακές διαταραχές.

Πολλαπλοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στη βιοδιαθεσιμότητα του ενδοθηλιακού NO, ιδιαίτερα όπως προαναφέρθηκε, στο ενζυματικό επίπεδο της eNOS. Παθοφυσιολογικά, η βιοδιαθεσιμότητα αυτή ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της αποδόμησης του μορίου. Βιοχημικά, η παραγωγή του ενδοθηλιακού NO ρυθμίζεται σε 3 διαφορετικά επίπεδα:

- 1) Έκφραση του γονιδίου της eNOS,
- 2) Ενζυματική δραστηριότητα της eNOS και
- 3) Αποδόμηση του NO [18].

Διαταραχή οποιουδήποτε από αυτούς τους μηχανισμούς, μειώνει το βιολογικά δραστικό NO και μπορεί να προκαλέσει ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, μηχανισμός που εν μέρει μπορεί να εξηγήσει την επιταχυνόμενη αθηροσκλήρωση που παρατηρείται σε αυτοάνοσα νοσήματα.

1.3. Ο ρόλος της eNOS στην αθηρογένεση. Μελέτες σε ζώα με έλλειψη του γονιδίου eNOS

Πρόσφατα, ο ρόλος της έλλειψης του NO που παράγεται από την eNOS στην αθηρογένεση, μελετήθηκε σε μοντέλα ζώων με απαλοιφή του γονιδίου.

Γενετική έλλειψη της eNOS οδήγησε σε εκτεταμένη αθηροσκλήρωση αλλά και σε υπέρταση σε ζώα διπλά ελλειπή για ApoE και eNOS [19], εύρημα που επιβεβαιώθηκε και από άλλη μελέτη [20], καταδεικνύοντας το ρόλο του ενζύμου στην προστασία των αγγείων κάτω από αθηρογόνες συνθήκες.

Στον αντίποδα των μελετών αυτών, αναφέρθηκε ότι, σε ζώα με έλλειψη eNOS, υπήρξε ελάττωση της αθηροσκληρωτικής περιοχής σε σχέση με άγριου τύπου ζώα, όταν και τα δύο τρέφονταν με υψηλή σε χοληστερίνη διαίτα. Η L-NAME, ένας αναστολέας της eNOS, ανέστειλε την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης στα άγριου τύπου ζώα, όχι όμως και στα ανεπαρκή σε eNOS, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι κάτω από αθηρογόνες συνθήκες, η eNOS δυσλειτουργεί, συμβάλλει στην οξείδωση της LDL χοληστερόλης και ότι η έλλειψη του ενζύμου αναστέλλει την αθηροσκλήρωση ως συνέπεια μειωμένης οξείδωσης της LDL [21].

1.4. Η eNOS ως ένζυμο παραγωγής Υπεροξειδίου

Η αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου, αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό των αθηροσκληρωτικών αγγείων και μέρος της παθοφυσιολογίας της αθηροσκλήρωσης. Η αντίδραση του παραγόμενου NO με υπεροξείδια μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του, επηρεάζει αρνητικά την αγγειοκινητική λειτουργία και αυξάνει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, μονοκύτταρων και λευκοκύτταρων στο ενδοθήλιο. Η παραγωγή υπεροξειδίου και άλλων

ενεργών ριζών οξυγόνου, αυξάνει την οξειδωτική τροποποίηση των λιπιδίων, επάγει την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων και αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έτσι το υπεροξειδίο μπορεί να θεωρηθεί ως προαθηρογόνο μόριο.

Η eNOS αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο ικανό να παράγει υπεροξειδίο. Σε συνθήκες παρουσίας μη επαρκών ποσοτήτων L-αργινίνης (το υπόστρωμα του ενζύμου), ή/και BH₄ (συμπαράγοντας), η ενεργοποίηση της eNOS οδηγεί στην «αποσύζευξη» του ενζύμου και παραγωγή υπεροξειδίου [22]-[23].

Ποντίκια με υπερέκφραση eNOS ανεπαρκή σε ApoE (ApoE -/-, /eNOS (Tg) παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά αθηροσκλήρωσης, αυξημένη παραγωγή NO στην αορτή και αυξημένη παραγωγή Υπεροξειδίων σε σχέση με ApoE (-/-) και άγριου τύπου ζώα [24].

1.5. Ρύθμιση του γονιδίου της eNOS

Πρόσφατες μελέτες έχουν υπογραμμίσει τη σημαντική συνεισφορά «της σταθερής κατάστασης» του m-RNA της eNOS, στη συνολική έκφραση του γονιδίου. Σε ανθρώπινους ιστούς από αθηροσκληρωτικά αγγεία, η έκφραση του m-RNA της eNOS, όπως φάνηκε με *in-situ* υβριδισμό, ήταν ελαττωμένη στα ενδοθηλιακά κύτταρα που κάλυπταν εκτεταμένη αθηρωματική πλάκα [25]-[26].

Ποικίλα εξωγενή ερεθίσματα και καταστάσεις που είναι σχετικά με την παθολογική βιολογία του ενδοθηλίου, έχειδειχθεί ότι αλλάζουν την έκφραση της eNOS μέσω τροποποίησης της «σταθερής κατάστασης» του m-RNA της [27].

Η ρύθμιση αυτή γίνεται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-γραφικό ή μεταφραστικό επίπεδο. Τα επίπεδα m-RNA δε σχετίζονται επομένως αποκλειστικά με τη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου αλλά και με άλλους παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα του πρωτογενούς μεταγραφήματος αλλά και τη μετα-μεταγραφική τροποποίηση του καθώς και το επίπεδο της μεταφραστικής του ικανότητας.

Το γονίδιο της eNOS κωδικοποιεί ένα m-RNA 4052 νουκλεοτιδίων και είναι παρόν σε ένα μόνο αντίγραφο στο απλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές του γονιδίου περιέχουν *cis* ρυθμιστικές DNA αλληλουχίες σε ένα υποκινητή ο οποίος δε διαθέτει το γνωστό «TATA» κουτί [9]. Σημαντικός θεωρείται ο ρόλος των SP1 και GATA *cis* ρυθμιστικών στοιχείων στο βασικό υποκινητή του γονιδίου [28].

Ο υποκινητής διαθέτει επίσης δύο cis ρυθμιστικά στοιχεία που χαρακτηρίζονται ως: θετική ρυθμιστική περιοχή I (PRD I) και θετική ρυθμιστική περιοχή II (PRD II), πάνω στα οποία προσδένονται ποικίλοι trans μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι τη βασική μεταγραφική μηχανή του γονιδίου [29].

Η εκλεκτική έκφραση της eNOS στα ενδοθηλιακά κύτταρα πιθανόν να ρυθμίζεται σε επιγενετικό επίπεδο, με τους μηχανισμούς που βασίζονται στην τροποποίηση της χρωματίνης μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή, σε ιστούς που το γονίδιο δεν εκφράζεται, να παίζουν σημαντικό ρόλο [30].

Σε μεταγραφικό επίπεδο, σημαντικός είναι ο ρόλος των αλλαγών στην αιματική ροή μέσα στα αγγεία αλλά και της φυσικής άσκησης που αυξάνουν τη μεταγραφή του γονιδίου της ενός, κινητοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες, κυριότερος των οποίων είναι ο NF-κB, που με τη σειρά τους προσδένονται στις αντίστοιχες αλληλουχίες DNA στον υποκινητή του γονιδίου [31].

Σε μεταγραφικό επίπεδο επίσης, ο TGF-β [32], αλλά και το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο Κυκλοσπορίνη A [33], αυξάνει την έκφραση του γονιδίου της eNOS.

Ωστόσο στον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου, σημαντικός είναι και ο ρόλος μεταγραφικών τροποποιήσεων, κυρίως σε επίπεδο m-RNA. Το m-RNA της eNOS είναι αρκετά σταθερό με χρόνο ημιζωής 24 έως 48 ώρες μετά από πλήρη μεταγραφική παύλα. Η υψηλή αυτή βασική σταθερότητα του m-RNA επηρεάζεται κυρίως από cis-mRNA στοιχεία στην 3-αμετάφραστη περιοχή του, που σχηματίζουν σταθερά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλεγματα [34].

Μετά από κυτταρική ενεργοποίηση του ενδοθηλίου από διάφορους παράγοντες φλεγμονής (TNF-α και Λιποπολυσακχαρίτες), και εφόσον τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου δεν αυξηθούν, τα επίπεδα σταθερής-κατάστασης του m-RNA θα μειωθούν επηρεάζοντας αρνητικά τη συνολική ποσότητα του παραγόμενου ενζύμου και άρα το βιοδιαθέσιμο NO [35]-[36].

1.6. Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος (Σ.Ε.Λ.) και NO

Ο Σ.Ε.Λ. αποτελεί μια πολυοργανική συστηματική αυτοάνοση διαταραχή αγνώστου αιτιολογίας, αν και διάφοροι γενετικοί παράγοντες, επηρεαζόμενοι από αντίστοιχους περιβαλλοντικούς παράγοντες, επηρεάζουν την ανάπτυξη της νόσου.

Χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, από ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών κλινικών εκδηλώσεων, όπως νεφρίτιδα, αγγειίτιδα, λεμφαδενοπάθεια ή αρθρίτιδα και μια ποικιλία ανοσολογικών χαρακτηριστικών. Ο Σ.Ε.Λ. χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή NO, ενώ συρρέουσες πληροφορίες, κυρίως από ζωικά μοντέλα, καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του μονοσθενούς αυτού αερίου στην παθογένεια της νόσου [37]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα του NO είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. σε σχέση με υγιείς εθελοντές, ενώ συσχέτιση έχει βρεθεί μεταξύ των επιπέδων NO του ορού και της δραστηριότητας της νόσου του Σ.Ε.Λ. [38]. Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά, δεν επιβεβαιώθηκαν προοπτικά, υποδηλώνοντας ότι ο ρόλος του NO στην παθογένεια του Σ.Ε.Λ. δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος [39].

1.7. Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (Ρ.Α.) και NO

Πολλαπλές μελέτες παρέχουν ενδείξεις ότι το NO μπορεί να είναι σημαντικό στην παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας [40]. Μονοκύτταρα περιφερειακού αίματος που απομονώθηκαν από ασθενείς με Ρ.Α. χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση της επαγόμενης συνθάσης NO (iNOs), και ενισχυμένη παραγωγή NO που σχετίζεται με τη δραστηριότητα της νόσου [41]. Το NO έχει θεωρηθεί επίσης ως μόριο διαμεσολαβητικό της κυτταρικής απόπτωσης μέσα στις αρθρώσεις των ασθενών με Ρ.Α. [42]. Ασθενείς με Ρ.Α. παρουσιάζουν διαταραχές στην εξαρτώμενη από το NO αγγειακή λειτουργία οφειλόμενη κυρίως σε υπερπαραγωγή NO, εύρημα ανάλογο με αυτό που παρατηρείται στη σήψη, κατά τη διάρκεια της οποίας η παραγωγή NO είναι σημαντικά αυξημένη [43]-[44].

1.8. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αγγειακές επιπλοκές

Αυξημένο οξειδωτικό στρες, οφειλόμενο κυρίως σε ελεύθερες ρίζες και στην υπερπαραγωγή NO, έχει προταθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των μικροαγγειακών επιπλοκών [45]. Δυσλειτουργία φυσιολογικών βιοχημικών διεργασιών παρατηρείται σε αυτές τις περιπτώσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα που επενδύουν την εσωτερική επιφάνεια όλων των αιμοφόρων αγγείων, αρτηριών και φλεβών. Ελαττωματικές πηξιολογικές διεργασίες, αυξημένη προσκολλητικότητα αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων, ελαττωματικός έλεγχος όγκου αίματος και ηλεκτρολυτών και κυρίως διαταραγμένη αγγειοδιασταλτική ικανότητα σε απόκριση στον όγκο του αίματος, αποτελούν εκφάνσεις της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας που χαρακτηρίζει την αρχή της επερχόμενης ανάπτυξης της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας [46] και που προϋπάρχει πριν η τελευταία καταστεί κλινικά εμφανής.

Οι περισσότερες, αν όχι όλες, από τις παραπάνω διαδικασίες ρυθμίζονται από το NO που παράγεται συνεχώς σε μικρές ποσότητες στα ενδοθηλιακά κύτταρα από την eNOS. Είναι εύκολο να θεωρηθεί ότι διαταραχές στην παραγωγή του NO μέσα στο αγγειακό ενδοθήλιο, επηρεάζει την ενδοθηλιακή ομοιόσταση και επομένως μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια των αγγειακών επιπλοκών που σχετίζονται τόσο με το Σ.Ε.Λ. όσο και με τη Ρ.Α.

Κατάλληλα ρυθμιζόμενη έκφραση της eNOS (και των συμπαραγόντων της), είναι βασική για την ικανοποιητική παραγωγή NO. Επομένως πολυμορφισμοί του γονιδίου της eNOS (σε επίπεδο DNA) που οδηγούν στην ελαττωματική παραγωγή eNOS ή σε ασταθή πρωτεΐνη, σε επίπεδο ποσοτικό ή λειτουργικό, μπορεί να οδηγήσουν είτε σε ελαττωματική παραγωγή είτε σε υπερπαραγωγή NO. Και οι δύο καταστάσεις συμβάλλουν στην επιταχυνόμενη αθηροσκλήρωση που μπορεί να σχετίζονται τόσο με την αγγειοπάθεια του Σ.Ε.Λ. όσο και της Ρ.Α.

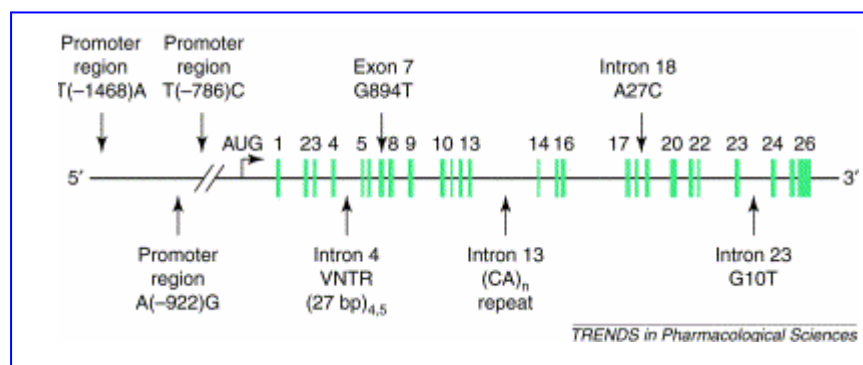
1.9. Γενετικοί πολυμορφισμοί της eNOS

Πολυάριθμοι γονιδιακοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της eNOS, έχουν συσχετισθεί με διάφορες αγγειακές, φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες νόσους όπως ο Σ.Ε.Λ. και η Ρ.Α., σε μερικούς πληθυσμούς. Λειτουργικά σημαντικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της eNOS,

μπορούν να επηρεάσουν την προδιάθεση για ανάπτυξη Σ.Ε.Λ και Ρ.Α. (ή των αγγειακών επιπλοκών τους), επηρεάζοντας το ποσό του ΝΟ που παράγεται από το ενδοθήλιο.

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της eNOS, είναι δυνατόν να αλλάξουν τα επίπεδα της έκφρασης του, μειώνοντας ή αυξάνοντας το ποσό της παραγόμενης πρωτεΐνης. Επομένως μπορεί να σχετίζονται είτε με την παθογένεια νοσημάτων όπως ο Σ.Ε.Λ., ή η Ρ.Α., ή με την εμφάνιση συγκεκριμένων κλινικών χαρακτηριστικών των νόσων αυτών όπως για παράδειγμα αθηροσκλήρωσης ή νεφρικών επιπλοκών.

Μέχρι στιγμής διάφορες πολυμορφικές περιοχές του γονιδίου έχουν καταγραφεί που αφορούν τόσο ιντρόνια όσο και εξόνια. Ορισμένοι από αυτούς αφορούν την 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή και τον υποκινητή του γονιδίου, το εξόνιο 7 και τα ιντρόνια 4, 13, 18 και 23 [47] (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση του γονιδίου που κωδικοποιεί την eNOS. Το ανθρώπινο γονίδιο της eNOS (που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7q35-36), περιέχει 26 εξόνια. Τα εξόνια απεικονίζονται με αριθμούς. Το AUG αποτελεί το εναρκτήριο σημείο της μεταγραφής. Συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου απεικονίζονται με βέλη.

Μερικοί από τους πολυμορφισμούς αυτούς είναι κοινί παγκοσμίως αλλά διαφέρουν σε διάφορες εθνικές ομάδες [48].

1.10. Γενετικός Πολυμορφισμός στο Ιντρόνιο 4 του Γονιδίου της eNOS

Μεταξύ των διαφόρων γονιδιακών πολυμορφισμών που αναφέρθηκαν, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου. Χαρακτηρίζεται από ένα ποικίλο αριθμό επαναλήψεων μιας παλλίνδρομης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων

αποτελούμενη από 27 ζεύγη βάσεων. Έχουν περιγραφεί αλληλόμορφα που φέρουν 4 επαναλήψεις της συγκεκριμένης αλληλουχίας (αλληλόμορφο a), 5 επαναλήψεις (αλληλόμορφο b) ή 6 επαναλήψεις (αλληλόμορφο c).

Η επίδραση του πολυμορφισμού στη δραστηριότητα της eNOS παραμένει ωστόσο ακόμα άγνωστη. Έχει προταθεί ότι ο πολυμορφισμός αυτός μπορεί να σχετίζεται με τα επίπεδα του NO στο πλάσμα. Διερεύνηση του πολυμορφισμού αυτού, κατέδειξε συσχέτιση μεταξύ του NO στο πλάσμα, της ύπαρξης του πολυμορφισμού και της εμφάνισης διαφόρων νόσων όπως πνευμονικό οίδημα σε μεγάλο υψόμετρο, στεφανιαίες αλλοιώσεις, βροχικό άσθμα και νεφρίτιδα [49]-[50].

Συγκεκριμένα το αλληλόμορφο με 4 επαναλήψεις (a αλληλόμορφο), σχετίστηκε με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, με διαταραχές των λιπιδίων του πλάσματος, ιδιοπαθείς επαναλαμβανόμενες αποβολές, εκσεσημασμένη διαβητική νεφροπάθεια, τελικού σταδίου νεφροπάθεια σε μη διαβητικούς καθώς και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, σε ορισμένους πληθυσμούς [51]. Ένας από τους κύριους λόγους για τη μελέτη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ., αποτελεί η συσχέτιση, που έχει δημοσιευθεί, να υπάρχει μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της καρδιονεφρικής νόσου.

1.11. Γενετικός Πολυμορφισμός στο Ιντρόνιο 4 του Γονιδίου της eNOS και Αυτοάνοσα Νοσήματα

Μελέτη του πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 4 της eNOS σε μια ομάδα Κορεατών ασθενών με νόσο Αδαμαντιάδη-Behcet, δεν κατέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά συγκρινόμενη με υγιείς εθελοντές [52]. Ομοίως, σε μια ασθενών ιταλικής καταγωγής με την ίδια νόσο, καμία συσχέτιση δε βρέθηκε μεταξύ του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και της νόσου [53].

Αντίθετα σε ένα πληθυσμό ασθενών Τουρκικής καταγωγής, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός, αλλά ο άγριου τύπου γονότυπος (b/b) και αλληλόμορφο (b) σχετιζόταν με την εμφάνιση της νόσου [54].

Σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ., έχουν αναφερθεί αντικρουόμενα αποτελέσματα για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Η παρουσία του αλληλομόρφου a σχετιζόταν με την ανάπτυξη νεφρίτιδας του Σ.Ε.Λ. σε μια κοορτή Κορεατών ασθενών, αλλά όχι με τη νόσο καθ' αυτή

[50]. Αντίθετα σε μια μελέτη ασθενών με Σ.Ε.Λ. από τη νοτιοδυτική Κολομβία (Ισπανικής καταγωγής), η παρουσία του άγριου τύπου γονοτύπου b/b και του αλληλομόρφου b σχετιζόταν ισχυρά με την εμφάνιση της νόσου [55].

Σε μια συγκριτική μελέτη μεταξύ ασθενών με Σ.Ε.Λ. καταγωγής Αφροαμερικανικής και Καυκάσιας, δε βρέθηκε συσχέτιση της νόσου με τον πολυμορφισμό, ο οποίος όμως διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο εθνικών ομάδων [51].

1.12. Σημασία Επιλογής του Κρητικού Πληθυσμού για μελέτη Συσχέτισης πολυμορφισμών με Νόσο

Μελέτες συσχέτισης γονιδιακών πολυμορφισμών με νοσήματα όπως ο Σ.Ε.Λ. ή η Ρ.Α. σε πληθυσμούς όπως ο Κρητικός, παρουσιάζουν πολλαπλά πλεονεκτήματα και παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες. Η Κρήτη είναι νησί με 650.000 κατοίκους περίπου, οι οποίοι μοιράζονται κοινό γενετικό και πολιτιστικό υπόβαθρο. Το κοινό αυτό περιβάλλον είναι αρκετά ελκυστικό καθώς σε τέτοιες «γεωγραφικά απομονωμένες» γενετικές δεξαμενές μπορούν να ανιχνευθούν συγκεκριμένες αλλαγές στη συχνότητα ορισμένων αλληλόμορφων σε σχέση με μεγαλύτερους και ανομοιογενείς πληθυσμούς, λόγω του φαινομένου της «διατήρησης» σπάνιων αλληλόμορφων. Επιπρόσθετα, λόγω της παρατεταμένης περιόδου γενετικής απομόνωσης και του μικρού ποσοστού «νόθευσης» του γονιδιώματος από εξωγενείς πηγές, έχει επιτελεσθεί σημαντική γενετική καθήλωση [56]. Τα σίγουρα πλεονεκτήματα απομονωμένων πληθυσμών, όπως ο Κρητικός, συνίστανται σε ένα δυναμικά υψηλότερο επιπολασμό ορισμένων νόσων, καλές γενεαλογικές καταγραφές και ομοιόμορφες περιβαλλοντικές επιδράσεις [57].

Οι γηγενείς Κρητικοί παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά μετανάστευσης, γεγονός που παρέχει τη γενετική ομοιογένεια του συγκεκριμένου πληθυσμού. Ο αποκαλούμενος «θόρυβος υποβάθρου» (background noise) που αποτελείται από όλους τους πιθανούς συνδυασμούς περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων που είναι παρόντες στον πληθυσμό, ελαχιστοποιείται σε ένα τέτοιο ομοιογενή πληθυσμό.

Λαμβάνοντας κανέναν υπόψη όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά, συνάγει ότι η μελέτη ενός μεγάλου αριθμού δειγματος δεν είναι απαραίτητη και προφανώς δεν είναι και εφικτή σε μια περιορισμένη γεωγραφική περιοχή.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει κατά πόσο ο γνωστός γονιδιακός πολυμορφισμός στο ιντρόνιο 4 της eNOS σχετίζεται με την ανάπτυξη Σ.Ε.Λ. ή Ρ.Α. σε ασθενείς με Κρητική καταγωγή καθώς και να καθορίσει το ρόλο του ως προδιαθεσικού παράγοντα στην παθογενετική διαδικασία της νόσου.

Καθώς ο Σ.Ε.Λ. και η Ρ.Α. αποτελούν πολυγονιδιακά νοσήματα με πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών παραγόντων και περιβάλλοντος, η ταυτοποίηση συγκεκριμένου γενετικού τόπου και συγκεκριμένης γονιδιακής παραλλαγής που μπορεί να σχετίζεται με την εμφάνιση τους, τουλάχιστον όσο αφορά ένα συγκεκριμένο εθνικό πληθυσμό, θα βοηθήσει στην αποσαφήνιση των μηχανισμών που μπορεί να εμπλέκονται στην παθοφυσιολογική διαδικασία.

Επιπροσθέτως, η επιβεβαίωση μιας τέτοιας συσχέτισης, μπορεί γρήγορα να αναγνωρίσει, με ένα σχετικά απλό έλεγχο, να ελέγξει και να εντοπίσει άτομα σε κίνδυνο όχι μόνο για την ανάπτυξη της νόσου αλλά και επιπλοκών της (καρδιαγγειακές, νεφρικές παθήσεις), οδηγώντας τα άτομα αυτά σε συστηματική παρακολούθηση, έγκαιρη ανίχνευση και δραστική αντιμετώπιση των επιπλοκών αυτών ευθύς με την εμφάνισή τους.

3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Ασθενείς-Υγιείς εθελοντές

Στην παρούσα μελέτη κινητοποιήθηκαν 2 ομάδες συμμετεχόντων.

Η πρώτη αποτελούνταν από 190 ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και 145 υγιείς εθελοντές. Όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωσμένο Σ.Ε.Λ. σύμφωνα με τα κριτήρια ACR και ήταν όλοι Κρητικής καταγωγής όπως προέκυψε από αναλυτική λήψη ιατρικού και κοινωνικού ιστορικού. Οι υγιείς εθελοντές ταίριαζαν σε ηλικία και φύλο με τους ασθενείς, ήταν επίσης Κρητικής καταγωγής και δεν είχαν ιστορικό ή οποιαδήποτε άλλη ένδειξη συστηματικού αυτοάνοσου νοσήματος.

Η δεύτερη ομάδα μελέτης αποτελούνταν από 202 ασθενείς με Ρ.Α. και 235 υγιείς εθελοντές. Όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωστεί ως έχοντες Ρ.Α. σύμφωνα με τα κριτήρια της ACR και ήταν Κρητικής καταγωγής. Οι υγιείς εθελοντές ταίριαζαν με τους ασθενείς σε ηλικία και φύλο με τους ασθενείς, ήταν επίσης Κρητικής καταγωγής και δεν είχαν ιστορικό ή οποιαδήποτε άλλη ένδειξη αυτοάνοσου νοσήματος.

Τόσο οι ασθενείς με Σ.Ε.Λ. όσο και οι ασθενείς με Ρ.Α. παρακολουθούνταν στο τμήμα Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑ.Γ.Ν.Η.) και είχε ληφθεί η συγκατάθεση τους, μετά από πλήρη ενημέρωση τους, για ότι αφορούσε τη συμμετοχή τους στη μελέτη.

Οι υγιείς εθελοντές συλλέχθηκαν σε συνεργασία με το τμήμα Αιμοδοσίας του ΠΑ.Γ.Ν.Η.

Από όλους τους μετέχοντες στη μελέτη, ολικό αίμα συλλέχθηκε σε ειδικά φιαλίδια με αντιπηκτικό EDTA, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση γενωμικού DNA.

3.2 Μέθοδοι

1) Εξαγωγή γενωμικού DNA από κύτταρα ολικού περιφερικού αίματος με εμπορικό kit (Puregene σύστημα απομόνωσης DNA της Gentra).

2) Ποσοτικός προσδιορισμός DNA

α) με φασματοφωτόμετρο

β) με κατασκευή πηκτώματος αγαρόζης 0,8%

3) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών.

4) Έλεγχος προϊόντων της PCR και γονοτύπηση με κατασκευή γέλης αγαρόζης. 3%.

3.2.1. Υλικά

Για την ολοκλήρωση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

- Διάλυμα TSE (NaCl 150mM, EDTA 100mM pH:8, Tris-Cl 20mM pH:8).
- Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 20% w/v
- Απόλυτη αιθανόλη
- 70% αιθανόλη
- RNase A 10mg/ml
- 100% ισοπροπανόλη (2 προπανόλη)
- Διάλυμα TBE 1x (90mM Tris-Cl, 90mM βορικό οξύ, 2mM EDTA)
- Διάλυμα χρωστικής 6x
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Πήκτωμα αγαρόζης 0.8%
- Διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC Lysis solution της Gentra)
- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Cell Lysis solution της Gentra)
- Διάλυμα κατακρήμνισης πρωτεϊνών (Protein Precipitation solution της Gentra)
- Ταq πολυμεράσης 5U της Minotech
- Νερό απιονισμένο και αποστειρωμένο

3.2.2. Εξοπλισμός

- Σωληνίσκοι μικροφυγοκέντρησης χωρητικότητας 1.5ml
- Μικροφυγόκεντρος για σωληνίσκους 1,5ml με δυνατότητα ανάπτυξης θερμοκρασιών ψύχους (marka)
- Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής (PTC-100 thermal cycler MJ Research Inc Watertown Ma, USA)
- Σωληνίσκοι χωρητικότητας 0.5ml κατάλληλοι για χρήση στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή, αποστειρωμένοι με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία για 20 λεπτά
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αγαρόζης
- Πηγή ηλεκτρικής τάσης
- Λάμπα υπεριώδους
- Εξοπλισμός για φωτογράφιση του πηκτώματος

3.2.3 Διαδικασία

1) Απομόνωση γενωμικού DNA με το Puregene DNA genomic purification kit της Gentra

Σε σωληνίσκο χωρητικότητας 1.5ml που περιέχει 900μl PRB Lysis Solution (διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων), προστίθενται 300μl περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό EDTA και το μείγμα επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13000 rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου, καταλείποντας ορατό λευκό κατακρημισθέν ίζημα των 10-20μl. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται στο υγρό με δυναμικό vortex, γεγονός που διευκολύνει τη μετέπειτα κυτταρική λύση. Στα διαλυμένα κύτταρα προστίθενται 300μl Cell Lysis Solution (διάλυμα λύσης κυττάρων) και το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η προσθήκη 100μl Protein Precipitation Solution (διάλυμα κατακρήμισης πρωτεϊνών), δυναμικό vortex σε υψηλή ταχύτητα για 20 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 0 λεπτά στις 13000 rpm. Στον πυθμένα καταλείπεται ορατό σκούρο καφέ πρωτεϊνικό ίζημα. Το υπερκείμενο που περιέχει το DNA, μεταφέρεται σε σωληνίσκο του 1.5ml, που περιέχει 300μl 100% ισοπροπανόλης για κατακρήμιση και μετά από ήπια ανακίνηση περίπου 50 φορές, φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στις 13000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το DNA παραμένει στο σωληνίσκο για στέγνωμα σε καθαρό απορροφητικό χαρτί. Ακολουθεί

προσθήκη 300μl 70% αιθανόλης και νέα φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 λεπτά. Τέλος, η αιθανόλη απομακρύνεται και το DNA στεγνώνει στον αέρα για να επαναιωρηθεί σε 100μl DNA Hydration solution (διάλυμα επαναιώρησης του DNA) στους 4 °C. Το DNA που απομονώθηκε με αυτόν τον τρόπο, αποθηκεύθηκε στους -20 °C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής του.

2) Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Η ποσότητα του DNA που περιέχεται σε κάθε δείγμα, προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2i) Φωτομέτρηση

Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στα 260nm. Οι πρωτεΐνες και ο αρωματικός δακτύλιος της φαινόλης απορροφούν στα 260nm αλλά και στα 280nm, όπου δεν απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα. Για να είναι καθαρό το δείγμα, πρέπει η απορρόφηση στα 260nm να είναι σχεδόν διπλάσια της απορρόφησης 280nm. Γίνονται επομένως δύο μετρήσεις και υπολογίζεται ο λόγος OD260/OD280. Ο λόγος αυτός πρέπει να είναι 1.6-2. Η ποσοτικοποίηση γίνεται από την τιμή της απορρόφησης μιας αιώρησης του αρχικού δείγματος 1ml 260nm. Για δίκλωνο DNA ισχύει ότι OD260=1, που σημαίνει ότι στο 1ml που μετρήθηκε περιέχονται 50μg DNA.

2ii) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, εκτός από τη δυνατότητα εκτίμησης του μεγέθους του και την προσεγγιστική ποσοτικοποίηση αυτού, δίνει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα του DNA και την περιεκτικότητα του σε RNA.

Υλικά:

- *1x διάλυμα TBE* (90 mM Tris-Cl, 90mM Βορικό οξύ, 2mM EDTA): πρόκειται για το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, που προσδίδει αγωγιμότητα στο πήκτωμα και τα ιόντα Βορικού οξέος.

- *6x διάλυμα χρωστικής:* το διάλυμα αυτό αναμειγνύεται με τα δείγματα για την καθήλωση του DNA όταν φορτώνεται στο πήκτωμα και την παρακολούθηση της κινητικής της ηλεκτροφόρησης.
- *Βρωμιούχο αιθίδιο:* προστίθεται στο πήκτωμα και στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Προσδένεται μεταξύ των δύο αλυσίδων της DNA έλικας, ώστε το σύμπλοκο αιθιδίου-DNA να φθορίζει όταν φωτίζεται με υπεριώδη ακτινοβολία.
- *Πήκτωμα αγαρόζης 0.8%:* η αγαρόζη διαλύεται σε TBE 1x με βρασμό. Στο διάλυμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο και στη συνέχεια αφήνεται να σταθεροποιηθεί σε ειδική μήτρα στην οποία τοποθετείται κατάλληλο χτένι για το σχηματισμό των θέσεων όπου φορτώνονται τα δείγματα.

Εξοπλισμός:

- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης
- Πηγή ηλεκτρικής τάσης
- Λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας
- Εξοπλισμός για φωτογράφιση του πηκτώματος και αποθήκευση των φωτογραφιών.

Διαδικασία:

10 ml δείγματος DNA αναμειγνύονται με 5ml διάλυμα χρωστικής. Τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα και στο ίδιο πήκτωμα φορτώνεται (σε παραπλήσια θέση και ένας ποσοτικός μάρτυρας (DNA λ βακτηριοφάγου γνωστής συγκέντρωσης). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120Volt για 45min – 1h. Στη συνέχεια, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται. Η ποσοτικοποίηση γίνεται συγκρίνοντας την ένταση της ζώνης του άγνωστου DNA με την ένταση της ζώνης του μάρτυρα. Το RNA, αν υπάρχει, φαίνεται με τη μορφή νέφους.

3) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) στηρίζεται στον ενζυματικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA που βρίσκεται μεταξύ δύο «εκκινητών» (primers). Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτίδια που συνήθως έχουν μήκος 20-30 bp, υβριδοποιούνται με συμπληρωματικές αλληλουχίες της DNA έλικας και κατευθύνουν την αντιγραφή του ενδιαμέσου τμήματος από την DNA πολυμεράση. Οι εκκινητές προσανατολίζονται από το 3' άκρο τους προς το τμήμα του DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι θερμικής αποδιάταξης του DNA-στόχου, υβριδοποίησης των εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία και επέκτασή τους από τη DNA πολυμεράση, καταλήγουν στον εκθετικό πολλαπλασιασμό του τμήματος του DNA που ορίζεται από τα 5' άκρα των εκκινητών. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι η Taq πολυμεράση, ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο του βακτηρίου *Thermus aquaticus*, ώστε να μη χρειάζεται η προσθήκη νέου ενζύμου μετά από κάθε στάδιο θερμικής αποδιάταξης.

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για να πολλαπλασιαστεί το τμήμα του γενωμικού DNA (από κάθε ασθενή και υγιή εθελοντή) που φέρει τον πολυμορφισμό στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου της eNOS. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραπάνω αντίδραση παρουσιάζονται στον **πίνακα 1**

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR για τη γονοτυπική ανάλυση του πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου της eNOS

Forward primer 5' AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT 3'
Reverse primer 5' TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC 3'

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 0.5μgρ ολικού γενωμικού DNA, 200ngρ από κάθε ένα από τους εκκινητές, 5μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, 25mM MgCl₂, 0,25mM από κάθε ένα από τα τέσσερα δεόξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50μl. Οι συνθήκες αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες:

- Αρχική αποδιάταξη του DNA: 94°C για 4min
- 36 κύκλοι:
 - αποδιάταξη του DNA: 94°C για 30sec
 - υβριδοποίηση εκκινητή στην αλληλουχία στόχο: 63°C για 30sec

- Επέκταση της αλύσου από την Taq πολυμεράση: 72°C για 1min.

- Τελική επέκταση: 72°C για 5min

Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης του εκκινητή με την αλληλουχία-στόχο χαρακτηρίζει κάθε ζεύγος εκκινητών και γενικά είναι 3-10°C μικρότερη από το Tm των εκκινητών. Εκκινητές με υψηλό GC% (υψηλό Tm) υβριδοποιούνται σε θερμοκρασίες άνω των 55°C. Χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης, κάτω των 50°C, ευνοούν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων, λόγω έκτοπης (μη ειδικής) πρόσδεσης των PCR εκκινητών. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε μικρό χρόνο, γιατί οι εκκινητές βρίσκονται σε περίσσεια. Ο χρόνος της επέκτασης εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας-στόχου. Για PCR προϊόντα μεγέθους 400-500bp αρκούν 30sec ως χρόνος επέκτασης. Η τελική επέκταση γίνεται με σκοπό της παραγωγής όσο το δυνατό πιο ολοκληρωμένων προϊόντων. Σε αυτό το στάδιο, η Taq πολυμεράση ολοκληρώνει τη σύνθεση των μορίων που δεν έχει προλάβει να ολοκληρώσει στους προηγούμενους κύκλους.

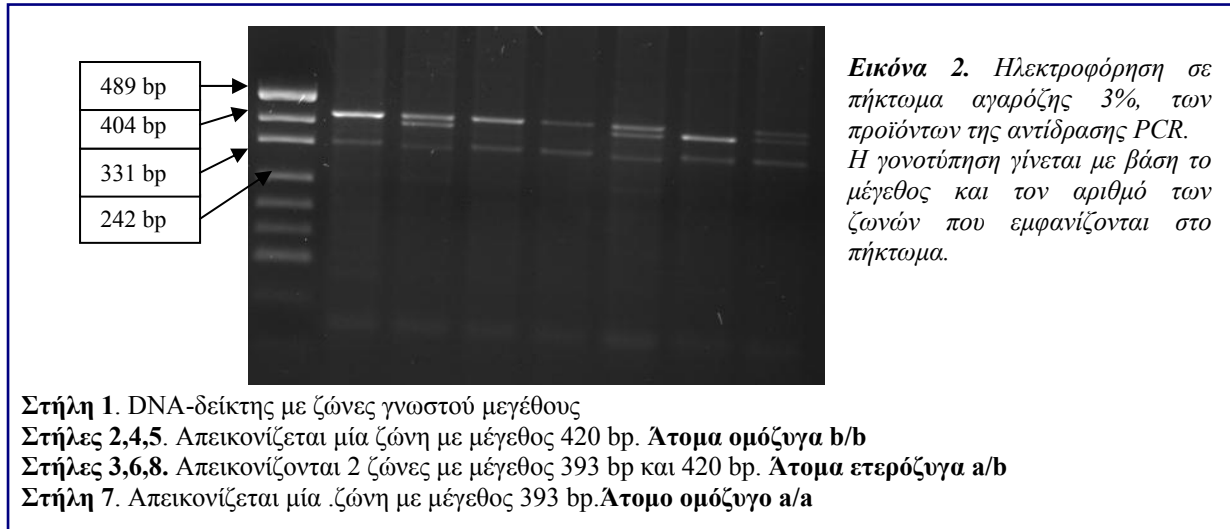
4) Έλεγχος των προϊόντων της PCR-Γονοτύπηση

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3%, με διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκαν 1 ή 2 ζώνες ανάλογα με το γονότυπο του κάθε συμμετέχοντα, σύμφωνα με τον παρακάτω **πίνακα 2**.

Πίνακας 2. Προϊόντα αντίδρασης PCR που προκύπτουν με βάση τον αριθμό των επαναλήψεων της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 27 bp στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου της eNOS και τα αλληλόμορφα στα οποία αντιστοιχούν.

Μέγεθος προϊόντος (σε ζεύγη βάσεων-bp)	Αριθμός επαναλήψεων 27νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	Αλληλόμορφο
393	4	a
420	5	b
447	6	c

Το μέγεθος κάθε ζώνης στη γέλη προσδιορίστηκε με βάση το γνωστό μέγεθος ζωνών ενός DNA δείκτη. Μία χαρακτηριστική εικόνα γονοτύπησης παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 2**).



3.3. Στατιστική ανάλυση

Η κατανομή των γονοτύπων και η σύγκριση των συχνοτήτων γονοτύπων και αλληλομόρφων μεταξύ των ομάδων έγινε με τη χ^2 δοκιμασία της ανεξαρτησίας. Τα Odds Ratios (O.R.) χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης εκτίμησης του σχετικού κινδύνου, με ένα 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη ασθενών - μαρτύρων για το Σ.Ε.Λ.

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΣΕΛ παρουσιάζονται στον **πίνακα 3**.

Πίνακας 3 Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με Σ.Ε.Λ (N=190)

Φύλο	
Γυναίκες (%N)	178 (94%)
Άνδρες (%N)	12 (6%)
Ηλικία (έτη)	39.82±13.27 ¹
Εθνικότητα	
Κρητική/Άλλη	190/0

¹ Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση

Η κατανομή των γονοτύπων και η συχνότητα των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 4 της eNOS, για τους ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και τους αντίστοιχους υγιείς εθελοντές παρουσιάζονται στον **πίνακα 4**.

Πίνακας 4 Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 4 της eNOS, όπως αναλύθηκαν στις ομάδες ασθενών με ΣΕΛ και υγιών εθελοντών. Ο γονότυπος eNOS 4 a/a, έχει συνυπολογιστεί μαζί με το γονότυπο eNOS 4 a/b λόγω του μικρού αριθμού ασθενών και υγιών που βρέθηκαν με αυτό το γονότυπο.

Γονότυπος	Ασθενείς Σ.Ε.Λ. N=190 (100%)	Ομάδα ελέγχου N=145(100%)	Τιμή p ¹	O.R (95% C.I.) ¹
Άγριος Τύπος b/b	136 (72%)	105 (72.4%)	Μη σημαντική	1.04 (0.64-1.69)
Μεταλλαγμένος a/b ή a/a	54 (28%)	40 (27.6%)		
Αλληλόμορφα				
Άγριου τύπου b	322 (84.33%)	247 (85.17%)	Μη σημαντική	1.034 (0.67-1.59)
Μεταλλαγμένο a	58 (15.27%)	41 (14.83%)		

¹ για την παρουσία του μεταλλαγμένου γονοτύπου (a/b ή a/a) ή του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (a) στην ομάδα ασθενών με ΣΕΛ συγκρινόμενη με την ομάδα υγιών εθελοντών

Ο πιο συχνός γονότυπος τόσο σε ασθενείς όσο και σε υγιείς ήταν ο b/b, σε ποσοστό 72% των ασθενών και 72.4% των υγιών. Οι μεταλλαγμένοι γονότυποι (a/b ή a/a) παρατηρήθηκαν σε 28% των ασθενών και 27.6% των υγιών. Παρά το γεγονός ότι ο μεταλλαγμένος γονότυπος ήταν ελάχιστα υψηλότερος στους ασθενείς, η διαφορά αυτή δεν κατάφερε να φθάσει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας, όπως εκτιμήθηκε, με τη χ^2 δοκιμασία της ανεξαρτησίας ($p < 1$). Δεν στοιχειοθετείται επομένως συσχέτιση του γονοτύπου αυτού με την εμφάνιση της νόσου, σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. Κρητικής καταγωγής, όπως φαίνεται άλλωστε και από τον υπολογισμό του O.R. ως μέτρο του σχετικού κινδύνου (O.R.: 1.04, 95% C.I.: 0.64, 1.69).

Ανάλογα ευρήματα παρατηρήθηκαν και όσο αφορά τη συχνότητα των 2 αλληλομόρφων (a και b) σε ασθενείς και υγιείς εθελοντές. Το αλληλόμορφο b ήταν το συχνότερα παρατηρούμενο, τόσο σε υγιείς (84.33%) όσο και σε ασθενείς (85.17%), ενώ το αλληλόμορφο a παρατηρήθηκε σε ποσοστό 15.27% στους ασθενείς και 14.83% στους υγιείς. Ξανά, η ελάχιστη αυτή παρατηρούμενη διαφορά δε φθάνει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας ($p < 1$).

Σημειώνεται ότι το τρίτο αλληλόμορφο στο ιντρόνιο 4 που έχει παρατηρηθεί σε άλλους εθνικούς πληθυσμούς (αλληλόμορφο c), δε βρέθηκε σε κανένα ασθενή ή υγιή εθελοντή.

Ο πολυμορφισμός επομένως στο ιντρόνιο 4 της eNOS δε σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου κάθε αυτής, ούτε σε επίπεδο γονοτύπου, ούτε και σε επίπεδο αλληλομόρφων. Η συσχέτιση του με άλλα κλινικά χαρακτηριστικά (κυρίως καρδιαγγειακής αιτιολογίας) αποτελεί θέμα περαιτέρω διερεύνησης.

4.2 Μελέτη ασθενών - μαρτύρων για τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΡΑ παρουσιάζονται στον **πίνακα 5**.

Πίνακας 5 Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΡΑ (N=202)	
Φύλο	
Γυναίκες (%N)	141 (70%)
Άνδρες (%N)	61 (30%)
Ηλικία (έτη)	60.57±16.61 ¹
Εθνικότητα	
Κρητική/Άλλη	202/0

¹ Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση

Η κατανομή των γονοτύπων και η συχνότητα των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 4 της eNOS, για τους ασθενείς με Ρ.Α. και τους αντίστοιχους υγιείς εθελοντές παρουσιάζονται στον **πίνακα 6**.

Πίνακας 6 Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 4 της eNOS όπως αναλύθηκαν στις ομάδες ασθενών με ΡΑ και υγιών εθελοντών. Ο γονότυπος eNOS 4 a/a, έχει συνυπολογιστεί μαζί με το γονότυπο eNOS 4 a/b λόγω του μικρού αριθμού ασθενών και υγιών που βρέθηκαν με αυτό το γονότυπο.

	Ασθενείς ΡΑ. N=202 (100%)	Ομάδα ελέγχου N=235(100%)	Τιμή p¹	O.R (95% C.I.)¹
Γονότυπος				
Άγριος Τύπος b/b	128 (63.36%)	180 (77%)	<0.01	1.89 (1.25-2.87)
Μεταλλαγμένος a/b ή a/a	74 (37.64%)	55 (23%)		
Αλληλόμορφα				
Άγριου τύπου b	327 (81%)	410 (87.28%)	<0.025	1.609 (1.11-2.32)
Μεταλλαγμένο a	77 (19%)	60 (12.72%)		

¹ για την παρουσία του μεταλλαγμένου γονοτύπου (a/b ή a/a), ή του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (a) στην ομάδα ασθενών με Ρ.Α. συγκρινόμενη με την ομάδα υγιών εθελοντών

Όπως και στην αντίστοιχη μελέτη για το Σ.Ε.Λ., ο συχνότερα παρατηρούμενος γονότυπος τόσο σε ασθενείς με Ρ.Α. όσο και στους αντίστοιχους υγιείς εθελοντές ήταν ο b/b

με ποσοστό 63.33% στους ασθενείς και 77% στους υγιείς. Ο μεταλλαγμένος γονότυπος (a/b ή a/a) παρατηρήθηκε σε ποσοστό 37.64% σε ασθενείς και 23% στους υγιείς εθελοντές.

Η συχνότητα του μεταλλαγμένου γονοτύπου ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές. Η δοκιμασία ανεξαρτησίας χ^2 έδειξε ότι η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 9.138$) με $p < 0.01$. Με βάση την πληροφορία αυτή, διαφαίνεται ότι υπάρχει σαφής συσχέτιση του μεταλλαγμένου γονοτύπου (a/b ή a/a) με την εμφάνιση της P.A. σε ασθενείς με Κρητική καταγωγή. Ο υπολογισμός O.R. ως μέτρο εκτίμησης του σχετικού κινδύνου, O.R. = 1.89. C.I. 95% (1.25-2.87), έδειξε ότι η παρουσία του γονοτύπου αυτού αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου κατά 1.609 φορές.

Όσο αφορά τα αλληλόμορφα, το b ήταν επίσης το συχνότερα παρατηρούμενο τόσο σε ασθενείς όσο και σε υγιείς (81% στους ασθενείς έναντι 87.28% στους υγιείς), ενώ το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο a βρέθηκε σε 19% των ασθενών και 12.72% των υγιών. Η δοκιμασία ανεξαρτησίας χ^2 κατέδειξε ότι το αλληλόμορφο a είναι συχνότερο στους ασθενείς με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.025$) ενώ η παρουσία του αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου κατά 1.609 φορές (O.R. 1.609, 95% C.I. 1.11-2.32).

Φαίνεται επομένως ότι το γονίδιο της eNOS και πιο συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός στο ιντρόνιο 4, σχετίζεται και σε επίπεδο γονοτύπου και σε επίπεδο αλληλομόρφων με την εμφάνιση της P.A. σε ασθενείς Κρητικής καταγωγής.

Η περαιτέρω συσχέτιση του με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της νόσου καρδιαγγειακής αιτιολογίας, αποτελεί θέμα μεγαλύτερης διερεύνησης.

Επισημαίνεται ότι το αλληλόμορφο c δε βρέθηκε σε κανένα ασθενή με P.A ή υγιή εθελοντή.

4.3 Συγκριτική μελέτη του πολυμορφισμού μεταξύ ασθενών με Σ.Ε.Λ. και P.A. Κρητικής καταγωγής

Η χρήση δύο διαφορετικών ομάδων υγιών εθελοντών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη κατέστη επιβεβλημένη λόγω της διαφορετικής αναλογίας φύλου στις ομάδες των ασθενών. Στους ασθενείς με Σ.Ε.Λ. το 93.66% ήταν γυναίκες και το 6.32% άνδρες, ποσοστά ανάλογα με την ομάδα ελέγχου.

Στην ομάδα της P.A. το 70% ήταν γυναίκες και το 30% άνδρες γεγονός που οδήγησε στη χρήση διαφορετικής ομάδας ελέγχου για αυτή τη μελέτη. Η κατανομή των γονοτύπων, τόσο του άγριου τύπου όσο και του μεταλλαγμένου στις δύο ομάδες υγιών που κινητοποιήθηκαν δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ($p < 1$), γεγονός που σημαίνει ότι η συλλογή του δείγματος ήταν σωστή, παρά τη χρήση δύο διαφορετικών ομάδων.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τη συσχέτιση μεταξύ διαφόρων υποψήφιων γονιδίων και την ανάπτυξη ή εξέλιξη του Σ.Ε.Λ. της Ρ.Α. ή/και συγκεκριμένων κλινικών εκδηλώσεων και των δύο νόσων, σε πληθυσμούς διαφορετικής εθνικής προέλευσης. Δοθείσης της ποικιλίας των βιολογικών ρόλων του NO καθώς επίσης και την ταχύτητα δράσης και απενεργοποίησης του, σε διάφορα κυτταρικά συστήματα, ο αυστηρός έλεγχος της παραγωγής και αποδόμησης του NO είναι απαραίτητος.

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η παρουσία γονιδιακών πολυμορφισμών της eNOS, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή NO στο ενδοθήλιο, μπορεί να επηρεάζει φαινοτύπους και εκβάσεις νόσων όπως τα αυτοάνοσα, ο σακχαρώδης διαβήτης, τα καρδιαγγειακά κ.λ.π.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε κατά πόσο ο πολυμορφισμός στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου της eNOS εμπλέκεται στην προδιάθεση για ανάπτυξη Σ.Ε.Λ. ή Ρ.Α. σε γηγενείς Κρητικούς, πληθυσμός με κοινό γενετικό και πολιτισμικό υπόβαθρο. Φάνηκε ότι υπήρχε μια αύξηση στη συχνότητα του a/b γονοτύπου και του a αλληλόμορφου του ιντρονίου 4 του γονιδίου της eNOS σε ασθενείς με Ρ.Α. σε σχέση με υγιείς εθελοντές, εύρημα το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ.

Μεταξύ πολλών πολυμορφισμών στο γονίδιο της eNOS που έχουν περιγραφεί, έχει καταστεί εμφανές ότι λειτουργικοί πολυμορφισμοί, αφορούν κυρίως τα εξόνια του γονιδίου που κωδικοποιούν ή αλλάζουν συγκεκριμένες αμινοξικές θέσεις στην πρωτεΐνη και παρουσιάζουν κύρια συνεισφορά στην ανάπτυξη συγκεκριμένων κλινικών εκδηλώσεων του Σ.Ε.Λ. ή/και της Ρ.Α. μέσω της παραγωγής παραλλαγμένης πρωτεΐνης.

Κάτω από το πρίσμα της παραπάνω παρατήρησης, ο ιντρονικός πολυμορφισμός στο γονίδιο της eNOS που αποτελεί το θέμα της συγκεκριμένης μελέτης, είναι λιγότερο πιθανό να διαθέτει λειτουργική σημασία από μόνος του σε σχέση με πολυμορφισμούς σε κωδικές περιοχές ή στον υποκινητή του γονιδίου. Παρ' όλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι η παρουσία του αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη αγγειακών νόσων όπως η στεφανιαία νόσος ή η διαβητική νεφροπάθεια. Το a αλληλόμορφο (με 4 επαναλήψεις στο γονίδιο), έχει συσχετιστεί, σε διάφορες μελέτες, με χαμηλά επίπεδα μεταβολιτών του NO στο πλάσμα, καθώς άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο αυτό (γονότυπος a/a) βρέθηκαν να έχουν 20% τουλάχιστον χαμηλότερα επίπεδα μεταβολιτών του NO σε σχέση με ομοζυγωτές b/b [58].

Ομοίως έχει αναφερθεί στο παρελθόν η καθαρή συσχέτιση του ιντρονικού πολυμορφισμού αυτού με τη διαβητική νεφροπάθεια του τύπου I ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδους διαβήτη. Η απαλοιφή μιας από τις 5 νουκλεοτιδικές επαναλήψεις στο ιντρόνιο 4, που αντιστοιχεί στην παρουσία του α αλληλόμορφου, επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου καθώς και το ρυθμό επεξεργασίας του πρωτογενούς μεταγραφήματος, οδηγώντας σε παραγωγή eNOS με μειωμένη ενζυματική δραστηριότητα και προφανώς σε μειωμένα επίπεδα NO στο ενδοθήλιο και στο πλάσμα [59].

Προς επιβεβαίωση του λειτουργικού ρόλου του πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 4 της eNOS, μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, καταδεικνύει ότι οι 27 νουκλεοτιδικές επαναλήψεις αποτελούν δομές που δρουν ως cis-ρυθμιστικά στοιχεία, πάνω στα οποία προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες, επηρεάζοντας τη συνολική μεταγραφή του γονιδίου. Μάλιστα ο πολυμορφισμός αυτός δρα συνεργικά με έναν άλλο περιγεγραμμένο πολυμορφισμό στον υποκινητή του γονιδίου (T -786 C), επηρεάζοντας σημαντικά τα επίπεδα του παραγόμενου ενζύμου. Είναι επομένως πιθανό, μελέτες συσχέτισης απλοτύπων και όχι μονήρων πολυμορφισμών, να αποδώσουν ευνοϊκότερα αποτελέσματα, όσο αφορά πολυγονιδιακές νόσους [60]. Εξάλλου ανάλογα ευρήματα για ιντρονικούς πολυμορφισμούς έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες ελέγχου λειτουργικότητας όπως για το γονίδιο του ανθρώπινου μεταφορέα της ντοπαμίνης [61], καθώς και για το γονίδιο SLC22A4 που κωδικοποιεί ένα οργανικό μεταφορέα κατιόντων. Στην τελευταία αυτή περίπτωση ένας ιντρονικός πολυμορφισμός στο γονίδιο, αλλάζει τη θέση πρόσδεσης ενός μεταγραφικού παράγοντα πάνω στο ιντρόνιο και αναφέρεται ότι συσχετίζεται με P.A [62]. Επιπλέον, σε ex vivo μελέτες κυτταροκαλλιιεργειών ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας (HUVEC), παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του γονοτύπου a/b (με δύο αλληλόμορφα 4 και 5 επαναλήψεων αντίστοιχα), στο ιντρόνιο 4, χαρακτηρίζεται από σημαντικά ελαττωμένη ποσότητα eNOS σε επίπεδο πρωτεΐνης, αλλά και σημαντικά μειωμένη δραστηριότητα του παραγόμενου ενζύμου σε σχέση με τον άγριο τύπου γονότυπο b/b [63].

Μια άλλη πιθανή ερμηνεία για τη συσχέτιση του ιντρονικού αυτού πολυμορφισμού με την εμφάνιση της νόσου, εν προκειμένω της P.A., αποτελεί η πιθανότητα το α αλληλόμορφο να μη σχετίζεται καθ' εαυτό, αλλά να βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) με άλλους μη αναγνωρισμένους ακόμα, λειτουργικούς πολυμορφισμούς είτε στο γονίδιο της eNOS είτε σε άλλα γονίδια.

Αντικρουόμενες συσχετίσεις μεταξύ του γονοτύπου της eNOS και ποικίλων βιοχημικών και κλινικών φαινοτύπων, αποτελεί ένα κοινό φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί

σε πολλές μελέτες, αλλά και για ποικίλα άλλα γονίδια και κλινικούς φαινοτύπους. Οι συσχετίσεις μεταξύ γονιδιακών πολυμορφισμών και φαινοτύπων μπορεί να ποικίλουν, ποιοτικά ή ποσοτικά, είτε μέσα στον ίδιο πληθυσμό ή μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, λόγω της επίδρασης διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων, τροποποιητικών γονιδίων ή αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων, κυρίως σε νοσήματα των οποίων η παθογένεια είναι πολυγονιδιακή, επηρεάζοντας και τροποποιώντας την απλή σχέση γονοτύπου-φαινοτύπου που ισχύει για τις μονογονιδιακές νόσους.

Στο πεδίο έρευνας για το Σ.Ε.Λ. και τη Ρ.Α., όπως και σε πολυάριθμα άλλα ερευνητικά πεδία που προσπαθούν να συνδέσουν γενετικούς πολυμορφισμούς με διάφορες νόσους, ο μεγάλος αριθμός αντικρουόμενων μελετών έχει οδηγήσει σε μια ασαφή εικόνα. Οι διαφορές που έχουν παρατηρηθεί στις μελέτες αυτές, είναι δυνατόν να αντιπροσωπεύουν διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο των πληθυσμών που μελετήθηκαν. Το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο αλληλεπιδρά με ποικίλους περιβαλλοντικούς παράγοντες οδηγώντας σε ποικιλία φαινοτύπων και συσχετίσεων μεταξύ των διαφόρων εθνοκοιτητων για το ίδιο νόσημα.

Επιπρόσθετα προβλήματα αφορούν επίσης, το μικρό μέγεθος δείγματος ασθενών ή υγιών που κινητοποιούνται για τις συγκεκριμένες μελέτες καθώς επίσης και ο ασαφής, πολλές φορές, ορισμός του υπό μελέτη φαινοτύπου.

Το πρόβλημα αρκετές φορές επιτείνεται από «σφάλματα δημοσίευσης» με θετικά αποτελέσματα συσχέτισης να γίνονται αποδέκτες μεγαλύτερης προσοχής από ότι τα αρνητικά ευρήματα.

Μέσα στο γενικότερο πλαίσιο αυτό που διέπει μελέτες συσχέτισης μεταξύ γονιδιακών πολυμορφισμών και πολυγονιδιακών νοσημάτων, ορισμένα συγκεκριμένα ισχυρά στοιχεία της παρούσας μελέτης, χρήζουν περαιτέρω συζήτησης.

Αναφέρθηκε το πρόβλημα της γενετικής ποικιλομορφίας και της εθνικής ποικιλότητας που παρατηρείται σε μελέτες για πολυπαραγοντικά νοσήματα. Στην παρούσα μελέτη, ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα, τουλάχιστον όσον αφορά άλλες μελέτες που προσπάθησαν να αποσαφηνίσουν το συγκεκριμένο θέμα, ήταν η αξιοσημείωτη προσοχή που δόθηκε τόσο στην επιλογή των ασθενών όσο και των υγιών εθελοντών, ώστε να είναι γενετικά και εθνικά ομοιογενείς. Όλοι οι ασθενείς και οι υγιείς εθελοντές που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη ήταν Κρητικής καταγωγής τουλάχιστον 2 γενιές πριν. Έτσι μειώθηκε το πιθανό σφάλμα που θα προέκυπτε κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, καθώς όλοι οι μη Κρητικής καταγωγής ασθενείς και υγιείς εξαιρέθηκαν. Συνέπεια αυτού, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δύσκολο να περιλαμβάνουν σφάλματα δειγματοληψίας.

Το σχετικά μικρό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει αυτή η μελέτη, αντισταθμίζεται από το γεγονός ότι οι γηγενείς Κρητικοί, παρουσιάζουν πολύ μικρά ποσοστά μετανάστευσης γεγονός που παρέχει τη γενετική ομοιογένεια αυτού του πληθυσμού [64], το οποίο σε συνδυασμό με την αναμενόμενη χαμηλότερη περιβαλλοντική ποικιλομορφία του πληθυσμού, καθιστά μη αναγκαία τη μελέτη ενός μεγάλου αριθμού δείγματος, το οποίο άλλωστε δε θα ήταν και εφικτό σε τόσο μικρή γεωγραφική περιοχή.

Πειστικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι ο Κρητικός πληθυσμός παρουσιάζει συγκεκριμένες διαφορές σε σχέση με άλλους πληθυσμούς σε πολλά σημεία που αντανακλούν προφανώς τη γενετική του σύνθεση. Για παράδειγμα πολλά αλληλόμορφα του γονιδίου DRB1 που είναι παρόντα σε διάφορες ομάδες της Ελλαδικής ενδοχώρας, απουσιάζουν από τους Κρητικούς. Αντίθετα, ο απλότυπος HLA-A2, B-13, DRB1 1601 βρέθηκε μόνο σε Κρητικούς [65]. Η μεταλλαγή R334W της κυστικής ίνωσης βρέθηκε να είναι συχνή μόνο στην Κρήτη [66]. Ομοίως η μεταλλαγή CCR-5-delta 32, στον υποδοχέα της χυμοκίνης CCR5, βρέθηκε σε αξιοσημείωτα μικρή συχνότητα στην Κρήτη, παρέχοντας έτσι καθυστερημένη εξέλιξη από τη λοίμωξη με τον ιό HIV στην κλινική εκδήλωση του AIDS [67]. Μια καινούρια μετάλλαξη μέσα στον υποκινητή του γονιδίου A της γ-σφαιρίνης, που αναφέρθηκε στην Κρήτη, είναι μοναδική σε όλη την ομάδα γονιδίων ομοιάζοντα στη β-σφαιρίνη των πρωτευνόντων, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) [68]. Επιπλέον, μεταλλαγές που προκαλούν εμφάνιση του παράγοντα V Leiden εμφανίζουν πολύ υψηλή συχνότητα στην Κρήτη και θεωρούνται από τις υψηλότερες παγκοσμίως [69].

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, φαίνεται λογικό να εξεταστεί η πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού της eNOS σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. ή/και P.A. στην Κρήτη, εκμεταλλευόμενοι τα οφέλη ενός τέτοιου πληθυσμού θεωρώντας αρκετά αξιόπιστα τα αποτελέσματα.

Η παρούσα μελέτη, αποτελεί την πρώτη προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η σχέση του πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 4 της eNOS σε ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και P.A. στην Κρήτη. Βρέθηκε ότι η παρουσία του a/b γονοτύπου σχετίζεται με την εμφάνιση της P.A. στο συγκεκριμένο πληθυσμό και ότι δρα ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου. Κάτι τέτοιο όμως δεν επιβεβαιώθηκε για τους ασθενείς με Σ.Ε.Λ.

Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να αποσαφηνιστεί ο υποθετικός, μέχρι στιγμής, λειτουργικός ρόλος του συγκεκριμένου πολυμορφισμού ή η υποθετική γενετική σύνδεσή του με άλλους λειτουργικούς πολυμορφισμούς, πάνω στην παραγωγή του NO και

της ενδοθηλιακής λειτουργίας εν γένει, που θα μπορούσε να ερμηνεύσει, μερικά τουλάχιστον, τα υψηλά ποσοστά αθηροσκλήρωσης και αγγειακών επιπλοκών που παρουσιάζουν ασθενείς με Σ.Ε.Λ. και Ρ.Α.

Μία ενδιαφέρουσα πρόσφατα παρατήρηση που προσπαθεί να ερμηνεύσει την αγγειοπάθεια σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα αποτελεί η διαταραχή της βιολογίας των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων και η συνακόλουθη αδυναμία τους για επιδιόρθωση του δυσλειτουργικού ενδοθηλίου. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται στο μυελό των οστών και μεταναστεύουν στις περιοχές της βλάβης συμβάλλοντας στην επιδιόρθωση κατεστραμμένου ή δυσλειτουργικού ενδοθηλίου.

Η διατήρηση και κινητοποίηση των βλαστικών αυτών κυττάρων από το μυελό, καθορίζεται από το τοπικό μικροπεριβάλλον, τη «φωλιά» των βλαστικών κυττάρων, που αποτελείται από οστεοβλάστες, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα [70]-[71]. Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες όπως ο VEGF και ο SDF-1 που παράγονται στις ισχαιμικές περιοχές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση EPCs από το μυελό των οστών και στην μετανάστευση τους στις περιοχές βλάβης [72]-[73]. Η κινητοποίηση των παραγόντων αυτών εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ βλαστικών και στρωματικών κυττάρων και επιτρέπει στα βλαστικά κύτταρα να απομακρυνθούν από το μυελό. Η κινητοποίηση αυτή μεσολαβείται από πρωτεΐνες με σημαντικότερες τις μεταλλοπρωτεΐνες του στρώματος (MMPs) [74]. Η MMP-9 φαίνεται ότι είναι η βασικότερη μεταλλοπρωτεΐνη στην επαγόμενη από VEGF και SDF-1 κινητοποίηση των βλαστικών κυττάρων [75].

Η eNOS που παράγεται συνεχώς στα ενδοθηλιακά κύτταρα του στρωματικού μικροπεριβάλλοντος του μυελού αποτελεί ουσιαστικό συστατικό της «φωλιάς» των βλαστικών κυττάρων και είναι βασική για την κινητοποίηση βλαστικών και προγονικών κυττάρων *in-vivo*, πιθανά μέσω ενεργοποίησης της MMP-9 [76]. Το παραγόμενο NO από την eNOS οδηγεί στην νιτροζυλίωση και ενεργοποίηση της MMP-9 [77] αλλά ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος. Καθώς η MMP-9 διαμεσολαβεί τη δράση του VEGF στην κινητοποίηση των EPCs, ένα υποθετικό μηχανιστικό μοντέλο θεωρεί την ενεργοποίηση της eNOS, ως ένα ενδιάμεσο βήμα στην σηματοδότηση από τον VEGF και στην εξαρτώμενη από την MMP-9 κινητοποίηση των EPCs από το στρώμα του μυελού [79]. Την άποψη αυτή ενισχύουν αναφορές ότι τα οιστρογόνα και οι στατίνες που αυξάνουν την κινητοποίηση των EPCs από το μυελό, όπως προαναφέρθηκε, ταυτόχρονα ενεργοποιούν και την eNOS μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt. [76], [79]-[80] Κατά πόσον ο γονιδιακός

πολυμορφισμός της eNOS επηρεάζει τη δράση της στο μυελό και στην κινητοποίηση των κυττάρων αυτών, μένει να διευκρινιστεί.

Νέες τεχνολογίες χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες DNA μπορούν να αποσαφηνίσουν δυνατούς συνδέσμους για την παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων. Προοπτικές μελέτες είναι επιβεβλημένες επίσης για να καθοριστεί ο προγνωστικός ρόλος των πολυμορφισμών της eNOs στην εμφάνιση της Ρ.Α. ή/και αγγειακών επιπλοκών της.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Wang XL, Wang J. **Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease.** *Mol Genet Metabol* 2000; 70: 241-251.
- [2] Moncada S. **Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine.** *R Soc Med* 1999; 92: 164-169.
- [3] Beckman JS, Koppenol WH. **Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: The good, the bad and the ugly.** *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-1437.
- [4] Marletta MA. **Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis.** *Cell* 1994; 78: 927-930.
- [5] Quyyum AA, Darak N, Andrews NP, et.al. **Nitric oxide activity in the human coronary circulation: impact of risk factors for coronary atherosclerosis.** *J Clin Invest* 1995; 95: 1747-1755.
- [6] Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, et.al. **Endothelium-dependent dilatation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction.** *J Am Col Cardiol* 1994; 24: 1468-1474.
- [7] Hingorani AD. **Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French lecture 2000.** *Atherosclerosis* 2001; 154: 521-527.
- [8] Oemas BS, Tschudi MR, Godoy N, et.al. **Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis.** *Circulation* 1998; 97: 2494-248.
- [9] Marsden PA, Heng HH, Scherer SW. et al. **Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene.** *J Biol Chem* 1993; 268: 17478-17488.
- [10] Sase K, Michel T. **Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets.** *Life Sci.* 1995; 57: 2049-2055.
- [11] Hunley TE, Iwasaki S, Homma T, Kon V. **Nitric oxide and endothelin in pathophysiological settings.** *Pediatr Nephrol* 1995; 9: 235-244.
- [12] Shinozaki K, Ayajiki K, Kashiwagi et.al. **Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: mechanisms underlying endothelial dysfunction in the insulin-**

- resistant state.** *J Pharmacol Sci.* 2004; 96: 401-5.
- [13] Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. et.al. **Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long term outcome of coronary heart disease.** *Circulation* 2000; 101: 1899-1906.
- [14] Lerman A, Zeiher AM. **Endothelial function and cardiac events.** *Circulation* 2005; 111: 363-368.
- [15] Halcox JP, Schenke WH, Zalos G. et.al. **Prognostic value of coronary endothelial dysfunction.** *Circulation* 2002; 106: 653-658.
- [16] Bugiardini R, Manfrini O, Pizzi C. et.al. **Endothelial function predicts future development of coronary artery disease: a study of women with chest pain and normal coronary angiograms.** *Circulation* 2004; 109: 2518-2523.
- [17] Verbeuren TJ, Coene MC, Jordaens FH. et.al. **Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. Influence of treatment with dipyridamole on endothelium-dependent and endothelium-independent responses on isolated aortas of control and hypercholesterolemic rabbits.** *Circ Res* 1986; 59: 496-504.
- [18] Yang Z, Ming XF. **Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis.** *Clin Med Res* 2005; 4: 53-65.
- [19] Knowlles JW, Reddick RL, Jennete JC, et.al. **Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS (-/-) ApoE (-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment.** *J Clin Invest* 2002; 105: 451-458.
- [20] Kuhlencordt PJ, Gyurka R, Han F, et.al. **Accelerated Atherosclerosis, aortic aneurysm formation and ischemic heart disease in Apolipoprotein E/ endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice.** *Circulation* 2001; 104: 448-454.
- [21] Shi W, Wang X, Shih DM, et.al. **Paradoxical reduction of fatty streak formation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.** *Circulation* 2002; 105: 2078-2082.
- [22] Katusic ZS. **Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin plays a role?** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H981-H986.
- [23] Xia Y, Tsai AL, Berka V, et.al. **Superoxide generation from endothelial nitric oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin dependent and tetrahydrobiopterin regulatory pro-**

- cess. *J Biol Chem* 1998; 273: 25804-25808.
- [24] Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et.al. **Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic formation in ApoE deficient mice.** *J Clin Invest* 2002; 110: 331-340.
- [25] Wilcox JN, Subramanian RR, Sundel CL, et al. **Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2479-2488.
- [26] Fukuchi M, Giaid A. **Endothelial expression of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in human coronary artery disease. Specific reference to underlying lesion.** *Lab Invest* 1999; 79: 659-670.
- [27] Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. **Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS II).** *Faseb J*;1998; 12: 773-790.
- [28] Zhang R, Min W, Sessa WC. **Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter: SP1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells.** *J Biol Chem* 1995; 270: 15320-15326.
- [29] Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai S, et.al. **Characterization of the human endothelial nitric oxide synthase promoter.** *J Biol Chem* 1999; 274: 3076-3093.
- [30] Chan Y, Fish JE, D'Abreo C, et.al.. **The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation.** *J Biol Chem.* 2004; 279: 35087-35100.
- [31] Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, et.al.. **Shear – Stress regulates endothelial nitric oxide synthase promoter activity through nuclear factor Kappa-B binding.** *J Biol Chem* 2004; 279: 163-168.
- [32] Saura M, Zaragosa C, Cao W, et.al. **Smad2 mediates transforming growth factor-β induction of endothelial nitric oxide synthase expression.** *Circ Res* 2002; 91: 806-813.
- [33] Navarro-Antolin J, Ray-Campos J, Lamas S. et.al. **Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase gene by Cyclosporine A. A role for activator protein-I.** *J Biol Chem.* 2000; 275: 3075-3080.
- [34] Robb GB, Tai SG, Mawj LA, et.al. **Functional characterization of eNOS 3'-mRNA regions: efficient translation and active stabilization of oligo(A) transcripts.** *Nitric Oxide* 2002; 6: 454-458.

- [35] Yoshizumi M, Perrela MA, Burnett J. C. et.al. **Tumor necrosis factor down regulates an endothelial intric oxide synthase m-RNA by shortening its half life.** *Circ Res.*1993; 73: 205-209.
- [36] MacNaul KL, Hutchinson NI. **Differential expression of iNOs and eNOS m-RNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions.** *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 196: 1330-1334.
- [37] Huang FP, Feng GJ, Lindop G, et.al.. **The role of interleukin 12 and nitric oxide in the development of spontaneous autoimmune disease in MRL/MP-lpr/lpr mice.** *J Exp Med* 1996; 183: 1447-1459.
- [38] Gilkeson G, Cannon C, Oates J, et.al. **Correlation of serum measures of nitric oxide production with lupus disease activity.** *J Rheumatology* 1999; 26: 318-324.
- [39] Wanchu A, Khullar M, Deodhar SD, et.al. **Nitric oxide synthesis is increased in patients with systemic lupus erythematosus.** *Rheumatol Int* 1998; 8: 41-43.
- [40] Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. **The role of nitric oxide in inflammation and immunity.** *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1141-1151.
- [41] St Clair EW, Wilkinson WE, Lang T et.al. **Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients.** *J Exp Med* 1996; 184: 1173-1178.
- [42] Van't Hof RJ, Hocking L, Wright PK, et.al. **Nitric oxide is a mediator of apoptosis in rheumatoid joints.** *Rheumatology* 2000; 39: 1004-1008.
- [43] Yki-Jarvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. **Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 630-634.
- [44] Weigert AL, Higa EM, Niederberger M, et.al. **Expression and preferential inhibition of inducible nitric oxide synthase in aortas of endotoxemic rats.** *J Am Soc Nephrol* 1995; 5: 2067-2072.
- [45] West IC, **Radicals and oxidative stress in diabetes.** *Diabet Med* 2000; 17: 171-180.
- [46] Forsterman U, Munzel T. **Endothelial nitric oxide synthase in vascular disese. From marvel to menace.** *Circulation* 2006; 113: 1708-1714.
- [47] Wang XL, Wang J. **Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease.** *Mol Genet Metabol* 2000; 70: 241-251.

- [48] Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, et.al. **Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms.** *Nitric Oxide* 2005; 12: 177-182.
- [49] Tsukada T, Yokoyama K, Tomoko Y, et.al. **Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 190-193.
- [50] Lee YH, Kim HJ, Rho YH, et.al. **Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with the development of lupus nephritis.** *Lupus* 2004; 13: 188-191.
- [51] Douglas G, Reilly C, Dooley MA, et.al. **Angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus.** *J Rheumatol* 2004; 31: 1756-1762.
- [52] Kim IU, Chang HK, Lee SS, et.al. **Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and Rheumatic diseases with vasculitis.** *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 1083-1087.
- [53] Salvaroni C, Boiardi L, Cusali B, et.al. **Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease.** *J Rheumatol* 2002; 29: 535-540.
- [54] Karasneh JA, Hajeer AH, Silman A. et.al. **Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease.** *Rheumatology* 2005;44:614-617.
- [55] Serrano NS, Paez C, Carrea PA, et.al. **Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus.** *J Rheumatol* 2004; 31: 2163-2168.
- [56] Heutink P, Oostra BA., **Gene finding in genetically isolated populations.** *Hum Mol Genet.* 2002; 11: 2507-15.
- [57] Peltonen L, Jalanko A,Varilo T. **Molecular genetics of the Finnish disease heritage.** *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1913-1923.
- [58] Tsukada T, Yokoyama K, Arai T. et.al. **Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 245: 190-3.

- [59] Zanchi A, Moczulski DK, Hanna LS, et al. **Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism.** *Kidney Int* 2000; 57: 405-413.
- [60] Wang J, Dunley D, Wang XL. **Haplotype specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency.** *Arter Thromb Vasc Biol* 2002; 22: e1-e4.
- [61] Greenwood TA, Kelsoe JR. **Promoter intronic variations affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene.** *Genomics* 2003; 82: 511-519.
- [62] Tokuhiko S, Yamada R, Chang X. et.al. **An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4 encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis.** *Nat Genet* 2003; 35: 341-348.
- [63] Song J, Yoon Y, Park KU, et.al. **Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentrations and enzyme activity in cultured human endothelial cells.** *Clin Chem* 2003; 49: 847-852.
- [64] Spanaki C, Plaitakis A. **Bilineal transmission of Parkinson disease on Crete suggests a complex inheritance.** *Neurology* 2004; 62: 815-7.
- [65] Arnaiz-Villena A, Iliakis P, Gonzalez-Hevilla M. et.al. **The origin of Cretan populations as determined by characterization of HLA alleles.** *Tissue Antigens*. 1999; 53: 213-26.
- [66] Estivill X, Bancells C, Ramos C, **Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium.** *Hum Mutat* 1997; 10: 135-154.
- [67] Apostolakis S, Baritaki S, Krambovitis E, Spandidos DA.. **Distribution of HIV/AIDS protective SDF1, CCR5 and CCR2 gene variants within Cretan population.** *J Clin Virol*. 2005; 34: 310-314.
- [68] Patrinos GP, Kollia P, Loutradi-Anagnostou A, et.al. **The Cretan type of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin [A gamma-158C-->T] results from two independent gene conversion events.** *Hum Genet* 1998; 102: 629-634.
- [69] Stiakaki E, Germanakis I, Sfyridaki C, et.al **Prevalence of Factor V Leiden and other thrombophilic traits among Cretan children with malignancy.** *Pediatr Blood Cancer* 2005; 44: 386-9.

- [70] Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. **Regulatory Mechanisms in Stem cell Biology** *Cell* 1997; 88: 287–298.
- [71] Zhang J, Niu C, Ye L, et.al. **Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size** *Nature* 2003; 425: 836-841.
- [72] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et.al. **VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** *EMBO J*;1999; 18: 3964-3972.
- [73] Askari AT, Unzek S, Popovic ZB,et.al. **Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy** *Lancet* 2003; 362: 697–703.
- [74] Lapidot T, Petit I. **Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells** *Experimental Hematology* 2002; 30: 973–981.
- [75] Heissig B, Hattori K, Dias S, et.al **Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand** *Cell* 2002; 109: 625–637.
- [76] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C et.al. **Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells.** *Nat. Med.* 2003; 9: 1370-1376.
- [77] Gu Z, Kaul M, Yan B, et.al. **S-Nitrosylation of Matrix Metalloproteinases: Signaling pathway to neuronal cell death** *Science* 2002; 297: 1186-1190.
- [78] Aicher A, Heeschen C, Dimmeler S. **The role of NOS3 in stem cell mobilization.** *Trends Mol Med* 2004; 10: 421-425.
- [79] Wakura A, Luedemann C, Shastry S, et.al. **Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase–dependent mobilization of bone marrow–derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury** *Circulation* 2003; 108: 3115-3121.
- [80] Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et.al. **HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway.** *J.Clin Invest* 2001; 108: 391-397.