



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

<<ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ>>

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Γενετική Ανάλυση των Γονιδίων *ENG* και *ACVRL1* σε Ασθενείς με Κληρονομική
Αιμορραγική Τελαγγειεκτασία.**

Άγγελος Γιαννακούλας

Ιατρός

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας (Επιβλέπων)
- Καλαλά Φανή, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων,
Διευθυντής του ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος
Ειδίκευσης στη Μοριακή Ανοσολογία.

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



MASTER PROGRAM IN

<<CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE>>

MASTER THESIS

Genome Analysis of *ENG* and *ACVRL1* genes in patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia

Angelos Giannakoulas

M.D

Examination Committee:

- Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology (Supervisor)
- Kalala Fani, Assistant Professor of Medical Immunology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases, Director of Master Program «Clinical Applications of Molecular Medicine»

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for Master in Molecular Immunology

Larissa, September 2024

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΗ ΤΕΛΑΓΓΕΙΕΚΤΑΣΙΑ.....	8
2. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΝΟΣΟΥ....	8
3. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	12
a. ΜΟΝΟΠΑΤΙ TGF- β	12
b. ΓΟΝΙΔΙΑ <i>ENG</i> ΚΑΙ <i>ACVRL1</i>	13
c. ΓΟΝΙΔΙΑ <i>MADH4</i> ΚΑΙ <i>GDF2</i>	14
4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΥΠΟΤΥΠΟΙ.....	14
5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	15

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ.....	20
2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	20
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	20
a. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	21
b. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>ENG</i> ΚΑΙ <i>ACVRL1</i> ..	22
c. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>ENG</i> ΚΑΙ <i>ACVRL1</i> ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	27
d. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>ENG</i> ΚΑΙ <i>ACVRL1</i>	28
e. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>ENG</i> ΚΑΙ <i>ACVRL1</i> ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ SANGER..	28
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30

a. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	30
b. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ.....	30
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024 υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Σπελέτα, διευθυντή του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σπελέτα για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και με δέχτηκε στο εργαστήριο το οποίο διευθύνει για να υλοποιήσω τις απαιτήσεις του μεταπτυχιακού προγράμματος. Τον ευχαριστώ για την καθοδήγηση και την στήριξη του καθ' όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών καθώς και για όλες τις πολύτιμες συμβουλές του για την μελλοντική μου πορεία ως ιατρός.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας για την συνεισφορά τους στην διεκπεραίωση των πειραμάτων. Ιδιαίτερη αναφορά οφείλω να κάνω στην κα Στυλιανή Σάρρου και στην κα Αθανασία Φουσίκα για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ την οικογένεια μου, η οποία με στηρίζει σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία, επίσης γνωστή και ως σύνδρομο Rendu-Weber-Osler, είναι μια σπάνια αγγειοπάθεια που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα. Η νόσος χαρακτηρίζεται από πολλαπλές αγγειακές βλάβες, όπως τελαγγειεκτασίες και αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις, καθώς και από αιμορραγικές εκδηλώσεις. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου 1 στα 5.000 άτομα πάσχουν, αν και πιθανώς ο επιπολασμός υποεκτιμάται λόγω της ασυμπτωματικής φύσης της νόσου σε ορισμένους ασθενείς. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία εμφανίζουν μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι του TGF-β. Το 90% των ασθενών, εμφανίζει κάποια γενετική βλάβη σε ένα από τα γονίδια *ENG* και *ACVRL1*. Η ανάδειξη της γενετικής βλάβης που αιτιολογεί το σύνδρομο της κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας είναι σημαντική για την γενετική συμβουλευτική οικογενειών, καθώς δίνεται η δυνατότητα της έγκαιρης διάγνωσης για όλα τα μέλη της οικογένειας. Αναλύσαμε γενετικά ασθενείς με κλινική εικόνα κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας που παρακολουθούνταν στο εξωτερικό ιατρείο του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Συνολικά εντάξαμε στην μελέτη 2 ασθενείς που πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια Curaçao για την κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία και στους οποίους δεν είχε προηγηθεί γενετικός έλεγχος. Ο πρώτος ασθενής βρέθηκε να είναι ετερόζυγος για την μετάλλαξη rs2139070482 του γονιδίου *ACVRL1* ενώ ο δεύτερος ασθενής είναι ετερόζυγος για την μετάλλαξη rs1057517944 του ίδιου γονιδίου.

Λέξεις-κλειδιά:

Κληρονομική Αιμορραγική Τελαγγειεκτασία, *ENG*, *ACVRL1*, γενετική ανάλυση

ABSTRACT

Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT), also known as Rendu-Weber-Osler syndrome, is a vasculopathy disorder that is inherited in an autosomal dominant fashion. Hallmark features of the disease include telangiectasias, arteriovenous malformations and secondary bleedings. The prevalence of HHT is estimated at 1 to 5.000 people. Yet, it should be stated that most studies underestimate the incidence of the disease due to its asymptomatic nature at some individuals. Previous studies have shown that the disease is caused by mutations in genes that participate in the transforming growth factor β signaling pathway. Of interest, in approximately 90% of cases a heterozygous mutation of *ENG* gene or *ACVRL1* is detected. Identification of the causative mutation of HHT syndrome is important for genetic counseling since it serves on time diagnosis for relatives. We analyzed patients with clinical features of HHT syndrome that were monitored in the outpatient clinic of the immunology department of University General Hospital of Larissa. In total, we enrolled 2 patients that appeared with the Curacao criteria. The first patient was heterozygous for the rs2139070482 mutation of the *ACVRL1* gene while the second patient was heterozygous for the rs1057517944 mutation of the *ACVRL1* gene. We did not detect any mutation of the *ENG* gene.

Key-words:

Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, *ENG*, *ACVRL1*, genome analysis

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΗ ΤΕΛΑΓΓΕΙΕΚΤΑΣΙΑ

Η κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία, επίσης γνωστή και ως σύνδρομο Rendu-Weber-Osler, είναι μια σπάνια αγγειοπάθεια που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα (1). Η νόσος χαρακτηρίζεται από πολλαπλές αγγειακές βλάβες, όπως τελαγγειεκτασίες και αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις, καθώς και από αιμορραγικές εκδηλώσεις. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου 1 στα 5.000 άτομα πάσχουν από την νόσο, αν και πιθανώς ο επιπολασμός υποεκτιμάται λόγω της ασυμπτωματικής φύσης της νόσου σε ορισμένους ασθενείς (2). Οι Louis Marie Rendu, William Osler και Frederick Parkes Weber υπήρξαν από τους πρώτους ερευνητές που περιέγραψαν τα κύρια χαρακτηριστικά της κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας (3–6). Το 1896 ο Louis Marie Rendu αναφέρθηκε στην περίπτωση ενός ενήλικα άντρα ο οποίος εμφάνιζε τελαγγειεκτασίες και υποτροπιάζουσες επιστάξεις. Υπήρξε ο πρώτος που υποπτεύθηκε ότι οι επιστάξεις οφείλονταν στις τελαγγειεκτασίες. Το 1901 ο William Osler αναφέρθηκε στην κληρονομικότητα της νόσου ενώ ταυτόχρονα παρατήρησε ότι η νόσος μπορεί να προσβάλλει και τα συμπαγή όργανα. Το 1907 ο Frederick Parkes Weber περιέγραψε τις τελαγγειεκτασίες των δακτύλων, εύρημα που απαντάται στην πλειοψηφία των ασθενών.

2. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΝΟΣΟΥ

Η διάγνωση της κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας είναι κυρίως κλινική και βασίζεται στα κριτήρια Curacao, τα οποία παρατίθενται παρακάτω (7):

- Αυτόματη Υποτροπιάζουσα Επίσταξη: απρόκλητες, επαναλαμβανόμενες αιμορραγίες από την μύτη
- Τελαγγειεκτασίες Βλεννογόνων: πολλαπλές σε χαρακτηριστικά σημεία (μύτη, χείλη, στοματική κοιλότητα, δάκτυλα)
- Αρτηριοφλεβώδεις Αναστομώσεις Σπλαχνικών Οργάνων

- Οικογενειακό Ιστορικό: Ύπαρξη συγγενή πρώτου βαθμού με Κληρονομική Αιμορραγική Τελαγγειεκτασία

Η παρουσία τριών, τουλάχιστον, κριτηρίων Curacao θέτει την διάγνωση της νόσου με βεβαιότητα, η παρουσία δυο εκ των τεσσάρων θέτει την υποψία πιθανής διάγνωσης ενώ όταν ένας ασθενής πληρεί μόλις ένα κριτήριο η νόσος απομακρύνεται από την διαφορο-διαγνωστική σκέψη του θεράποντα ιατρού. Στην εποχή μας, όπου οι μοριακές τεχνικές αλληλούχησης είναι ευρέως διαδεδομένες, η γενετική ανάλυση των ασθενών είναι μια αρκετά σημαντική εξέταση που προσφέρει την δυνατότητα τεκμηρίωσης ή αποκλεισμού της νόσου σε περιπτώσεις όπου η διάγνωση με βάση τα κλινικά κριτήρια είναι αμφίβολη.

Η κλινική συμπτωματολογία και σημειολογία της κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας ποικίλει, από ασυμπτωματική έως απειλητική για την ζωή των ασθενών. Η ετερογένεια αυτή πιθανώς αντανακλά την βαρύτητα της υποκείμενης γενετικής βλάβης του κάθε ασθενή. Η μεγάλη πλειοψηφία όμως των ασθενών εμφανίζει αιμορραγικές εκδηλώσεις, τελαγγειεκτασίες και αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις, όπως αναλύεται παρακάτω:

A. Επιστάξεις

Οι ρινορραγίες αποτελούν την πιο συχνή αιμορραγική εκδήλωση των ασθενών με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία. Στην πλειονότητα των ασθενών αποτελεί την πρώτη εκδήλωση της νόσου, η οποία εμφανίζεται στην παιδική ηλικία. Υπολογίζεται ότι οι μισοί περίπου ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία θα εμφανίσουν το πρώτο επεισόδιο επίσταξης έως την ηλικία των 10 ετών και έως την ηλικία των 21 ετών το 80%-90% των ασθενών (8). Οι ρινορραγίες είναι αυτόματες και συχνότερα συμβαίνουν κατά τις νυκτερινές ώρες. Παρόλο, που προκαλούν δυσφορία στους ασθενείς η αντιμετώπιση τους είναι εύκολη και συνήθως δεν απαιτείται κάποια ιδιαίτερη ιατρική παρέμβαση.

B. Τελαγγειεκτασίες

Οι τελαγγειεκτασίες είναι μικρές δυσπλαστικές αγγειακές βλάβες που παρατηρούνται κυρίως σε δερματικές επιφάνειες και κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα. Εμφανίζονται στην μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών, ενώ οι βλάβες γίνονται εμφανείς κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής (9). Στο δέρμα, οι συχνότερες εστίες προσβολής είναι τα χείλη, το πρόσωπο και οι ράγες των δακτύλων ενώ στο γαστρεντερικό οι βλάβες εκτείνονται από την γλώσσα έως και το δωδεκαδάκτυλο (10). Παρόλο που οι τελαγγειεκτασίες παραμένουν κλινικά σιωπηλές, μπορούν να αποτελέσουν εστίες αιμορραγιών.



ΕΙΚΟΝΑ 1 : Τελαγγειεκτασίες δακτύλων, χειλέων και γλώσσας σε ασθενή με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία (10).

C. Αρτηριοφλεβώδεις Αναστομώσεις

Σε αντίθεση με τις τελαγγειεκτασίες, οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις είναι ευμεγέθεις ‘ανώμαλες’ αγγειακές επικοινωνίες μεταξύ φλεβών και αρτηριών τα συμπτώματα των οποίων οφείλονται σε θρόμβωση, εμβολή και διαφυγή αίματος. Οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις μπορούν να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε εσωτερικό

όργανο του σώματος. Συχνότερα όμως παρατηρούνται στο ήπαρ, στον πνεύμονα, και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις του ήπατος εμφανίζονται περίπου στο 70% των ασθενών. Είναι συνήθως ασυμπτωματικές αλλά μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπάρκεια ήπατος λόγω ισχαιμίας και επιβάρυνση της καρδιακής λειτουργίας αν η διαφυγή του αίματος είναι μεγάλη. Οι πνευμονικές αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις εμφανίζονται στους μισούς περίπου ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία. Θεωρείται ότι υπάρχουν εκ γενετής αλλά αυξάνονται σε μέγεθος με τον χρόνο και προκαλούν συμπτώματα όπως αιμόπτυση και δύσπνοια (11). Δευτεροπαθώς, μπορεί να εμφανιστούν εκδηλώσεις από το αιμοποιητικό (πολυκυτταραιμία) και από το κεντρικό νευρικό σύστημα (αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο λόγω θρομβοεμβολής) (12). Οι αναστομώσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα συχνότερα επηρεάζουν τον εγκέφαλο και οι βλάβες είναι κατά κανόνα πολλαπλές. Παρόλο που παρατηρούνται σε μικρό ποσοστό των ασθενών, η παρουσία τους προδιαθέτει σε σοβαρές επιπλοκές όπως επιληπτικά επεισόδια, λοιμώξεις καθώς και μη ειδικά συμπτώματα από την πίεση ζωτικών περιοχών του εγκεφάλου.

D. Λοιπές Εκδηλώσεις από άλλα Συστήματα

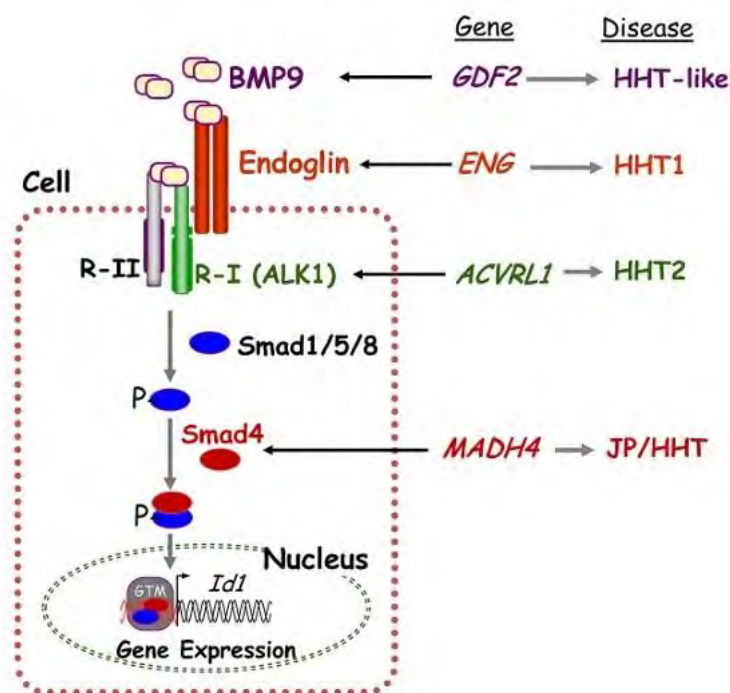
Παρόλο που οι συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις της κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας αναφέρονται παραπάνω, σπανιότερα οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν θρομβοεμβολικά επεισόδια, κίρρωση ήπατος, πνευμονική υπέρταση και εκδηλώσεις από το νευρικό σύστημα, ευρήματα τα οποία οφείλονται στις αγγειακές επιπλοκές της νόσου. Αξίζει ακόμη να αναφερθεί πως οι γυναίκες με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία έχουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου από αιμορραγία αρτηριοφλεβωδών αναστομώσεων κατά την διάρκεια κύησης (13). Αρκετοί ασθενείς εμφανίζουν αγχώδεις εκδηλώσεις, καταθλιπτική συνδρομή καθώς και δυσκολίες ένταξης στο κοινωνικό σύνολο και χρήζουν υποστήριξης από ειδικό ψυχικής υγείας. Τέλος, οι ασθενείς εμφανίζουν σιδηροπενία και συνοδό σιδηροπενική αναιμία, συνεπακόλουθο των πολλαπλών επεισοδίων αιμορραγίας.

3. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η Κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία είναι νόσος που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι του TGF-β. Η νόσος ακολουθεί το μοντέλο της απλο-ανεπάρκειας, όπου η έλλειψη ενός λειτουργικού αλληλόμορφου σε κάποιο από τα εμπλεκόμενα γονίδια οδηγεί στην εμφάνιση της κλινικής συμπτωματολογίας (14). Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζει κυρίως μεταλλάξεις σε 2 γονίδια, το γονίδιο *ENG* και το γονίδιο *ACVRL1*. Υπολογίζεται ότι περίπου το 90% των ασθενών φέρουν γενετική βλάβη σε κάποιο από αυτά τα δυο γονίδια (15). Παρόλα αυτά, νεότερες μελέτες έχουν δείξει ότι στην παθογένεση της νόσου εμπλέκονται και άλλα γονίδια πέραν των *ENG* και *ACVRL1* (16).

3.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙ TGF-β

Το μονοπάτι του TGF-β ελέγχει τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την απόπτωση και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (15). Πιο συγκεκριμένα, μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β συνδέονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς ALK-1 και ενδογλίνη. Ακολουθεί μετάδοση του σήματος ενδοκυττάρια και φωσφορυλίωση των μορίων R-Smads. Τα μόρια R-Smads σχηματίζουν ετεροδιμερή και συνδέονται με το μόριο Smad4. Έπειτα, το σύμπλοκο μεταφέρεται στον πυρήνα και ελέγχει την έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την φυσιολογική ενδοθηλιακή λειτουργία.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β (15).

3.2 ΓΟΝΙΔΙΑ *ENG* ΚΑΙ *ACVRL1*

Το γονίδιο *ENG* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9q34.11 και κωδικοποιεί την ενδογλίνη ενώ το γονίδιο *ACVRL1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q13.13 και κωδικοποιεί τον υποδοχέα ALK1. Όπως προαναφέρθηκε, οι δυο υποδοχείς εμπλέκονται στην σηματοδότηση του TGF-β μονοπατιού. Περισσότερες από 600 μεταλλάξεις έχουν συνολικά περιγραφεί στην διεθνή βιβλιογραφία οι οποίες οδηγούν σε μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα των προϊόντων των 2 γονιδίων (17). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις παρατηρούνται σε όλα τα εξόνια των 2 γονιδίων με τις σημειακές μεταλλάξεις, που οδηγούν σε τροποποίηση ενός αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα του γονιδιακού προϊόντος, να αποτελούν τον πιο κοινό τύπο γενετικής βλάβης. Εξίσου συχνές, βέβαια, είναι και οι προσθήκες-ελλείψεις βάσεων καθώς και οι 'stop codon' βλάβες που οδηγούν σε πρόωρη εμφάνιση ενός κωδικονίου λήξης και την παραγωγή μιας μικρότερης μη λειτουργικής πεπτιδικής αλυσίδας (18). Μεγάλες ελλείψεις βάσεων, ελλείψεις εξονίων ή και ολόκληρου αλληλόμορφου είναι σπάνιες και παρατηρούνται στο 6-10% των ασθενών (19). Αξίζει να σημειωθεί πως μικρή μερίδα ασθενών εμφανίζει μεταλλάξεις στις 5 αμετάφραστες περιοχές,

υποδηλώνοντας έτσι την ανάγκη της κάλυψης και αυτών των περιοχών στα διαγνωστικά προγράμματα αλληλούχησης (20).

3.3 ΓΟΝΙΔΙΑ *MADH4* ΚΑΙ *GDF2*

Μελέτες αλληλούχησης ασθενών με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία που δεν εμφάνιζαν μεταλλάξεις στα γονίδια *ENG* και *ACVRL1*, οδήγησαν στην ανάδειξη νέων γονιδίων, όπως το *MADH4* (SMAD family member 4) και το *GDF2* (growth differentiation factor 2), τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου. Περίπου 10% των ασθενών εμφανίζουν μεταλλάξεις στα γονίδια *MADH4* και το *GDF2* (15). Το γονίδιο *MADH4* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Smad4 ενώ το γονίδιο *GDF2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BMP-9. Η πρωτεΐνη BMP-9 είναι ο κύριος συνδέτης των υποδοχέων ALK1 και ενδογλίνης ενώ η πρωτεΐνη Smad4 είναι υπεύθυνη για την κάθοδο του σήματος του μονοπατιού του TGF-β από το κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων προς τον πυρήνα. Έχουν περιγραφεί 100 και πλέον μεταλλάξεις στο γονίδιο Smad4, με την πλειοψηφία εξ αυτών να είναι σημειακές παρόλο που έχουν περιγραφεί ακόμα και ελλείψεις μεγάλων τμημάτων του γονιδίου (16). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *GDF2*, αν και σπάνιες, μπορούν να αποτελέσουν αίτιο εμφάνισης της νόσου. Μια πρόσφατη γενετική ανάλυση 191 ασθενών έδειξε ότι 3 ασθενείς με τελαγγειεκτασίες και αιμορραγικές εκδηλώσεις, χωρίς γενετικές βλάβες στα γονίδια *ENG*, *ACVRL1* και Smad4, εμφάνιζαν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BMP-9 (21). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως σε μια μικρή μερίδα ασθενών δεν ανιχνεύονται γενετικές βλάβες σε κανένα από τα προαναφερθέντα γονίδια, υποδηλώνοντας έτσι ότι πιθανώς και άλλα γονίδια εμπλέκονται στην εμφάνιση του συνδρόμου.

4. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ

Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία εμφανίζουν τις κλινικές εκδηλώσεις που προηγουμένως αναφέρθηκαν. Ωστόσο, η ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων, η βαρύτητα των συμπτωμάτων και οι συνοδές επιπλοκές τους ποικίλουν μεταξύ των ασθενών, αντανakλώντας την ετερογένεια της υποκείμενης γενετικής βλάβης. Το γεγονός αυτό

οδήγησε τους επιστήμονες σε μια προσπάθεια ταξινόμησης της νόσου σε υπότυπους ώστε να μπορεί να προβλεφθεί η πορεία της νόσου και οι ασθενείς να λαμβάνουν την βέλτιστη παρακολούθηση και θεραπεία. Πλέον, αναγνωρίζονται 4 υπότυποι της νόσου. Ο 1^{ος} υπότυπος (HHT1) παρατηρείται σε ασθενείς με γενετικές βλάβες στο γονίδιο της ενδογλίνης, ο 2^{ος} υπότυπος (HHT2) παρατηρείται σε ασθενείς με βλάβες στο γονίδιο *ACVRL1*, ο 3^{ος} υπότυπος (HHT3) παρατηρείται σε ασθενείς με βλάβες στο γονίδιο *MADH4* ενώ ο 4^{ος} υπότυπος (HHT-like) παρατηρείται σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *GDF2*. Ο αριθμός και το είδος των αρτηριοφλεβωδών αναστομώνσεων ποικίλει ανάλογα με τον υπότυπο της νόσου. Οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις στον πνεύμονα και στο κεντρικό νευρικό σύστημα εμφανίζονται συχνότερα στον υπότυπο HHT1 ενώ οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις στο ήπαρ εμφανίζονται πιο συχνά στον υπότυπο HHT2 (22). Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, αν και σπάνια επιπλοκή της νόσου, απαντάται πιο συχνά στους ασθενείς με HHT2 (23). Ο υπότυπος HHT3, που οφείλεται σε απλοανεπάρκεια της πρωτεΐνης Smad4, αποτελεί ένα μεικτό σύνδρομο που συνδυάζει συμπτώματα κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας και νεανικής οικογενούς πολυποδίασης (24). Πέραν των ευρημάτων της κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας, οι εν λόγω ασθενείς εμφανίζουν ταυτόχρονα πολυποειδείς βλάβες του γαστρεντερικού σωλήνα ενώ ο κίνδυνος για ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου είναι ιδιαίτερα αυξημένος. Παρόμοια, στον υπότυπο HHT-like οι ασθενείς εμφανίζουν κλινικά σημεία και συμπτώματα τόσο κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας όσο και ενός άλλου κληρονομικού συνδρόμου, του CM-AVM (capillary malformation-arteriovenous malformation syndrome) (21).

5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Παρά τις εντατικές προσπάθειες για ανεύρεση αιτιολογικής θεραπείας, η αντιμετώπιση των ασθενών με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία παραμένει υποστηρικτική και εξαρτάται από τα συμπτώματα που θα εμφανίσει ο εκάστοτε ασθενής. Παρακάτω συνοψίζεται η θεραπευτική αντιμετώπιση των κύριων σημείων της νόσου:

5.1 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΕΠΙΣΤΑΞΗΣ

Οι ρινορραγίες των ασθενών με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία αποτελούν το πιο συχνό εύρημα της νόσου. Για την πρόληψη των επεισοδίων, συστήνεται η χρήση τοπικών φυσικών προϊόντων τα οποία ενυδατώνουν την ρινική κοιλότητα και μειώνουν το κίνδυνο αιμορραγίας των τελαγγειεκτασιών (25). Σε ασθενείς με ενεργό ρινορραγία συστήνεται η χρήση τοπικά τρανεξαμικού οξέος, το οποίο δρα ως προ-πηκτικός παράγοντας. Οι ασθενείς που εμφανίζουν πολλαπλές, υποτροπιάζουσες ρινορραγίες μπορούν να χρησιμοποιούν από του στόματος β-αποκλειστές και οιστρογόνα ως μέσο προφύλαξης. Σε ανθεκτικές περιπτώσεις, όπου τα τοπικά και συστηματικά μέτρα αντιμετώπισης δεν αρκούν, οι ασθενείς μπορεί να υποβληθούν σε παρεμβατικές μεθόδους για την αντιμετώπιση της υποκείμενης αιτίας των ρινορραγιών, δηλαδή των τελαγγειεκτασιών. Σκληροθεραπείες, συνεδρίες laser, ηλεκτροχειρουργική και χρήση ραδιοσυχνοτήτων για την καταστροφή των τελαγγειεκτασιών είναι τεχνικές που στην καθημερινή πράξη εφαρμόζονται. Από αυτές τις τεχνικές, η σκληροθεραπεία και η χρήση laser είναι οι πιο αποτελεσματικές και οικονομικές τεχνικές (26).

5.2 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΡΤΗΡΙΟΦΛΕΒΩΔΩΝ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΕΩΝ

5.2.1 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΡΤΗΡΙΟΦΛΕΒΩΔΩΝ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΕΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο εμβολισμός αποτελεί την θεραπεία εκλογής για τις αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις του πνεύμονα. Συστήνεται στους ασθενείς όταν η προσαγωγός αρτηρία της αναστόμωσης έχει διάμετρο μεγαλύτερη των 1-3 χιλιοστών (27). Σε μεγάλο ποσοστό ασθενών, η αναστόμωση μπορεί να επανασηραγγοποιηθεί και να επανεμφανιστούν τα συμπτώματα του ασθενή. Για τον λόγο αυτό, συστήνεται οι ασθενείς να υποβάλλονται συχνά σε απεικονιστικές εξετάσεις ώστε να προληφθεί εγκαίρως τυχόν υποτροπή. Σε ανθεκτικές περιπτώσεις ασθενών με πολλαπλές υποτροπές, παρά τους εμβολισμούς, και σε ασθενείς με διάχυτες βλάβες μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταμόσχευση πνευμόνων (28).

5.2.2 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΡΤΗΡΙΟΦΛΕΒΩΔΩΝ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΕΩΝ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ

Οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις του γαστρεντερικού αντιμετωπίζονται ενδοσκοπικά. Συστήνεται περιοδικός έλεγχος των ασθενών με ενδοσκοπήσεις ανώτερου και κατώτερου γαστρεντερικού τόσο για την παρακολούθηση του μεγέθους των αναστομώσεων όσο και για την έγκαιρη ανίχνευση τυχόν κακοήθειας σε ασθενείς με HHT3 υπότυπο της νόσου. Επί ενδείξεων, μπορεί να πραγματοποιηθεί τοπικός καυτηριασμός ή έγχυση σκληρυντικών-αιμοστατικών ουσιών (29). Σε περίπτωση οξείας αιμορραγίας από αναστόμωση του γαστρεντερικού συστήματος, οι ασθενείς θα πρέπει να εισάγονται στο νοσοκομείο και να αντιμετωπίζονται με ενδοφλέβια υγρά, μεταγγίσεις επί μεγάλης πτώσης του αιματοκρίτη και ενδοσκοπικής επίσχεσης της αιμορραγίας. Τέλος, σε ασθενείς με αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις ήπατος με συνοδές επιπλοκές από το καρδιαγγειακό συστήνεται ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος (30).

5.2.3 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΡΤΗΡΙΟΦΛΕΒΩΔΩΝ ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΕΩΝ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η αντιμετώπιση των αρτηριοφλεβωδών αναστομώσεων του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι αρκετά σύνθετη και απαιτείται συνεργασία πολλών ιατρικών ειδικοτήτων για την βέλτιστη αντιμετώπιση τους. Διάφορες τεχνικές μπορούν να εφαρμοστούν όπως χειρουργική αφαίρεση, εμβολισμός και ακτινοθεραπεία. Η επιλογή της καλύτερης τεχνικής βασίζεται στο μέγεθος και την θέση των βλαβών. Ορισμένοι, βέβαια, ερευνητές προτείνουν την συντηρητική παρακολούθηση των ασθενών με επαναλαμβανόμενες απεικονιστικές εξετάσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος εφόσον το μέγεθος των αναστομώσεων είναι μικρό, δεν εμφανίζονται νευρολογικά συμπτώματα και ο κίνδυνος ρήξης είναι μικρός (30).

5.3 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

5.3.1 ΑΝΤΙ-ΙΝΩΔΟΛΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Τα αντι-ινωδολυτικά φάρμακα αποτελούν θεραπεία πρώτης γραμμής για τους ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία. Κύριοι εκπρόσωποι είναι το τρανεξαμικό οξύ και το αμινοκαπροϊκό οξύ. Παρόλο που η χρήση τους ως τοπικά σκευάσματα αμφισβητείται, η συστηματική χρήση τους έχει δείξει σαφή πλεονεκτήματα με μείωση της συχνότητας των επιστάξεων και αύξηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης των ασθενών (31,32).

5.3.2 ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΑΥΞΑΝΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *ENG* ΚΑΙ *ACVRLI*

Μια εναλλακτική θεραπευτική επιλογή αποτελεί η χρήση φαρμάκων που αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων *ENG* και *ACVRLI*, αποκαθιστώντας έτσι την λειτουργική απλοανεπάρκεια των προϊόντων των δυο γονιδίων. Τέτοια φάρμακα είναι οι ρυθμιστές των οιστρογονικών υποδοχέων τα οποία διεγείρουν τον Sp1 εκινητή, ο οποίος ελέγχει την μεταγραφή των γονιδίων *ENG* και *ACVRLI* (33). Κλασικό παράδειγμα αποτελεί το tacrolimus το οποίο έχει φανεί να διεγείρει την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τον σχηματισμό νέων αγγείων (34).

5.3.3 ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Το Bevacizumab και η θαλιδομίδη είναι φάρμακα τα οποία μπλοκάρουν τον υποδοχέα VEGF. Το Bevacizumab έχει φανεί να μειώνει τα επεισόδια αιμορραγίας, να βελτιώνει τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης, να μειώνει τις ανάγκες για μεταγγίσεις και να μειώνει τον κίνδυνο εξέλιξης της ηπατικής νόσου. Προς το παρόν, τα συγκεκριμένα φάρμακα ενδείκνυται σε ασθενείς με σοβαρά επεισόδια ρινορραγιών και αιμορραγιών από το γαστρεντερικό καθώς και σε ασθενείς με ηπατικές αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις που προκαλούν συμπτώματα από το καρδιαγγειακό (35). Άλλοι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται συχνά σε ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία είναι οι β-αποκλειστές και η εταμσυλάτη (36,37).

5.3.4 ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Μετά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα του Bevacizumab ως συστηματική θεραπεία για τους ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία, οι έρευνες έχουν στραφεί σε μόρια τα οποία ρυθμίζουν το μονοπάτι του VEGF-β. Το Nintedanib, ένας ανταγωνιστής τυροσινικής κινάσης, δρα στους υποδοχείς του VEGF καθώς και στους αυξητικούς παράγοντες αιμοπεταλίων και ινοβλαστών και χρησιμοποιείται σε ασθενείς με HHT2 υπότυπο (38). Το Sorafenib έχει φανεί να μειώνει τα επεισόδια γαστρεντερικής αιμορραγίας και να εμποδίζει τις αιμορραγίες από τις τελαγγειεκτασίες (39). Άλλες υπό εξέλιξη κλινικές μελέτες ελέγχουν την αποτελεσματικότητα της πομαλιδομίδης και της δοξκυκλίνης (38).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία εμφανίζουν σε υψηλό ποσοστό μεταλλάξεις στα γονίδια *ENG* και *ACVRL1*. Μεταλλάξεις στα εν λόγω γονίδια εμφανίζονται περίπου στο 90% των ασθενών για αυτό και θεωρούνται παθογνωμονικές για την επιβεβαίωση της νόσου εφόσον συνδυάζονται με κλινική συμπτωματολογία και σημειολογία. Τις τελευταίες δεκαετίες, διεθνείς μελέτες οδήγησαν στην ανεύρεση αρκετών παθογόνων μεταλλάξεων που ενοχοποιούνται για την εμφάνιση της νόσου. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες σε ασθενείς του ελλαδικού χώρου. Για τον λόγο αυτό, αναλύσαμε γενετικά ασθενείς με κλινική συμπτωματολογία κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας με σκοπό την ανεύρεση αιτιολογικών γενετικών βλαβών, γνωστών και νέων, οι οποίες παρατηρούνται σε ασθενείς με ελληνική καταγωγή.

2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην μελέτη συμμετείχαν ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία οι οποίοι παρακολουθούνταν στο εξωτερικό ιατρείο του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η διάγνωση της νόσου βασίστηκε στα κριτήρια Curaçao ενώ κανένας από τους ασθενείς δεν είχε υποβληθεί σε γενετικό έλεγχο στο παρελθόν για την επιβεβαίωση της διάγνωσης.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε λήψη περιφερικού αίματος σε σωληνάριο γενικής αίματος με αντιπηκτικό K3EDTA και άμεση επεξεργασία του δείγματος.

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από το ληφθέν περιφερικό αίμα με την χρήση του εμπορικού kit EXTRACTME GENOMIC DNA EM13 KIT (Blirt), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πηγή DNA αποτέλεσαν τα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος, για αυτό και το πρώτο βήμα αποτέλεσε η λύση και απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Πιο συγκεκριμένα, 200μl ολικού περιφερικού αίματος αναμείχθηκαν με 1mL λυτικού διαλύματος ερυθρών σε σωληνάριο φυγοκέντρησης Eppendorf των 1,5ml. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου έως την πλήρη λύση των ερυθροκυττάρων. Μετά το μίγμα φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα 8.600 x g για 4 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με προσθήκη διαλύματος GL Buffer (Blirt). Στη συνέχεια προστέθηκε 4μl RNAάσης και ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 10 min. Το ένζυμο αυτό αποτελεί ενδοριβονουκλεάση που έχει στόχο την αποικοδόμηση και απομάκρυνση του RNA. Ακολούθησε προσθήκη 10μL πρωτεϊνάσης K και επώαση στους 55 °C για 30 min. Το ένζυμο αυτό αποτελεί μία πρωτεάση της σερίνης που διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς και αναστέλλει τις ενδονουκλεάσες, αποτρέποντας τη διάσπαση και κατακρήμνιση του DNA. Σκοπός του ενζύμου είναι η απομάκρυνση κυτταρικών και ιστονικών πρωτεϊνών προσδεμένων στο DNA, μέσω της πέψης πεπτιδικών δεσμών σε αλειφατικά, αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα. Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη 400μL διαλύματος GB Buffer και ήπια ανάδευση έως την ομογενοποίηση του μείγματος. Το διάλυμα αυτό, περιέχει άλατα υψηλής ιοντικής ισχύος, που κάνουν το DNA πιο υδρόφοβο διασπώντας δεσμούς DNA με μόρια H₂O και αιθανόλη που απομακρύνει τα μόρια H₂O. Έτσι, το DNA καθιζάνει καθώς είναι μη διαλυτό στην αιθανόλη. Έπειτα, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 2 min με ταχύτητα 13.000 x g και το υπερκείμενο που προέκυψε μεταφέρθηκε σε στήλη με σωληνάρια συλλογής υγρού. Το περιεχόμενο της στήλης φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα 13.000 x g για 1 min και έπειτα ο σωλήνας συλλογής απορρίφθηκε. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής. Ακολούθησαν 2 πλύσεις της στήλης με τα διαλύματα GW1 (600μL) και GW2 (500μL) στις 13.000 x g για 30 sec. Τα διαλύματα αυτά μέσω των αλάτων τους, προκαλούν αλλαγή του pH ώστε να διασφαλίσουν την απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων υλικών που πιθανόν δρουν ανασταλτικά για την PCR και άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής είναι η εξαγωγή βέλτιστης ποιότητας DNA. Έπειτα, αφού το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής απορρίφθηκε,

ακολούθησε φυγοκέντρωση με ταχύτητα 16.000 x g για 2 min. Τέλος, η στήλη μεταφέρθηκε στο τελικό σωλήνα αποθήκευσης. Προστέθηκαν σε κάθε στήλη 100μL διαλύματος έκλουσης, ακολούθησε επώαση για 5 min και τελική φυγοκέντρωση στις 13.000 x g για 1 min. Η συγκέντρωση του DNA ήταν περίπου 30-100ng/μL. Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, αποθηκεύτηκαν μέχρι την χρήση τους σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *ENG* ΚΑΙ *ACVRL1*

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των εξονίων των γονιδίων *ENG* και *ACVRL1* με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής Veriti 96 Well Thermacycler (Applied Biosystems) και ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο ως μάρτυρας με απεσταγμένο ύδωρ, αντί γενετικού υλικού. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

3.2.1 PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ENG*

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των 15 εξονίων του γονιδίου *ENG* με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR. Σχεδιάστηκαν πρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές με την χρήση του προγράμματος PrimerBlast. Για γειτνιάζοντα εξόνια, με μικρές παρεμβαλλόμενες ιντρονικές περιοχές, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενισχύουν ταυτόχρονα δυο κοντινές εκφραζόμενες περιοχές. Οι πρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

<u>ΕΞΟΝΙΟ</u> <u>ΣΤΟΧΟΣ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ</u> <u>ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ</u>	<u>ΜΕΓΕΘΟΣ</u> <u>ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ</u>
ΕΞΟΝΙΟ 1	F: CTTCTCCTGACCCCTCGGC	459bp

	R: AAAGAGTCAGCCCAGTTTGCC	
ΕΞΟΝΙΟ 2	F: GTGGCTGTGATGATGCAGGAA	390bp
	R: GCCTAACGAGGACTCAGCCA	
ΕΞΟΝΙΟ 3	F: GCCAGAGGGACAGGCACTA	464bp
	R: GAGACCATTGGCTTCACCAGG	
ΕΞΟΝΙΟ 4	F: AGGGGCTGATCTGACTGCTA	484bp
	R: GGCTTGTGGCATGTGAACTG	
ΕΞΟΝΙΟ 5-6	F: CCCACCACTATCTTTGGCTGT	837bp
	R: TGGGCATAGGTGATTTGTCCT	
ΕΞΟΝΙΟ 7-8	F: GGGACACAGCAGGACCGAG	903bp
	R: AAGTGGGAAAATAAGGCTTGCAG	
ΕΞΟΝΙΟ 9-10	F: TGGGTTGTGGTCAGTCCTTG	609bp
	R: CTTGCCAGGAGTTTCCCGAG	
ΕΞΟΝΙΟ 11-12	F: GAGTCAGGCAACTCCACAGG	939bp
	R: ATTAAGGCTCCGCCCCCTCA	
ΕΞΟΝΙΟ 13	F: GAAGCGGTGGAGATGGGATT	282bp
	R: CCTTGCCATGTGCTATGTGC	
ΕΞΟΝΙΟ 14-15	F: GAGCAGAGCTGGCACCAAAG	586bp
	R: AGAGCAGGCTCCATTCTGGG	

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Πρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου *ENG*.

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 100–200ng DNA, 210 $\mu\text{mol/L}$ από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1.02 μmol από τον κάθε εκκινητή, 1.52 mmol/L MgCl_2 και 0.04 U/ μL του ενζύμου Taq πολυμεράση. Ο τελικός όγκος του μείγματος της αντίδρασης ήταν 30 μL . Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι συνθήκες κάθε αντίδρασης αναλυτικά: θερμοκρασία και η διάρκεια του κάθε σταδίου (αποδιάταξη, υβριδισμός, επιμήκυνση).

<u>ΕΞΟΝΙΟ</u>	<u>ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR</u>
1	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 35 κύκλους (94 °C για 30 sec, 64 °C για 30 sec, 72 °C για 40 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
2	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 60 °C για 30 sec, 72 °C για 40 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
3	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 29 κύκλους (94 °C για 30 sec, 64 °C για 30 sec, 72 °C για 40 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
4	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 30 κύκλους (94 °C για 30 sec, 60 °C για 30 sec, 72 °C για 40 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
5-6	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 30 κύκλους (94 °C για 30 sec, 63 °C για 30 sec, 72 °C για 55 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
7-8	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 29 κύκλους (94 °C για 30 sec, 61 °C για 30 sec, 72 °C για 60 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
9-10	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 29 κύκλους (94 °C για 30 sec, 60 °C για 30 sec, 72 °C για 45 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
11-12	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 30 κύκλους (94 °C για 30 sec, 60 °C για 30 sec, 72 °C για 60 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
13	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 30 κύκλους (94 °C για 30 sec, 60 °C για 30 sec, 72 °C για 40 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
14-15	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 30 κύκλους (94 °C για 30 sec, 63 °C για 30 sec, 72 °C για 45 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Συνθήκες PCR για την ενίσχυση εκφραζόμενων περιοχών του γονιδίου *ENG*.

3.2.2 PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ACVRL1*

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των 9 εκφραζόμενων περιοχών του γονιδίου *ACVRL1* με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR. Σχεδιάστηκαν πρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές με την χρήση του προγράμματος PrimerBlast. Για γειτνιάζοντα εξόνια, με μικρές παρεμβαλλόμενες ιντρονικές περιοχές, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενισχύουν ταυτόχρονα δυο κοντινές εκφραζόμενες περιοχές. Οι πρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα 3:

<u>ΕΞΟΝΙΟ</u> <u>ΣΤΟΧΟΣ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ</u> <u>ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ</u>	<u>ΜΕΓΕΘΟΣ</u> <u>ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ</u>
ΕΞΟΝΙΟ 2	F: CTCCTGCCTCCCCTCC	296bp
	R: GCTCCTACATTCTCCCCAGC	
ΕΞΟΝΙΟ 3-4	F: CAAGGTGTTTGTCTGAGGGG	872bp
	R: CGGCTCTAATCTCTGGGTGA	
ΕΞΟΝΙΟ 5-6	F: GCAGGTCCCAGGTCGAGG	784bp
	R: CAGGGTTCTGTTAATGTCTGGAGG	
ΕΞΟΝΙΟ 7	F: CTGTCTCTGACCTAAGCCACAT	574bp
	R: GTCTTGCGGAGGAGAACTGA	
ΕΞΟΝΙΟ 8	F: CTGTTTCTCTCAGTCCCCACC	384bp
	R: TGACTGCAAACCTCCCAGG	
ΕΞΟΝΙΟ 9	F: CTCAGGGGTAGCGTGTCCA	395bp
	R: ACCTAGAGAGGTGCCCTAACC	
ΕΞΟΝΙΟ 10	F: GGCTTGAGTGCTCCTGAAGAT	643bp
	R: CCAGCTGTATTTTGGCTGGG	

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Πρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου *ACVRL1*.

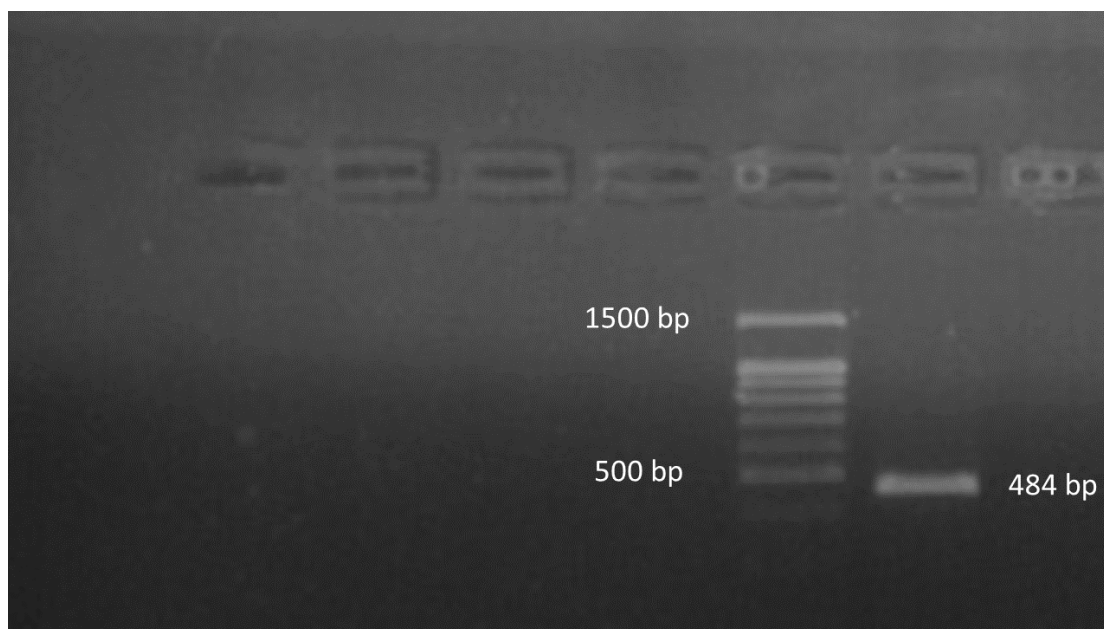
Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 100–200ng DNA, 210 μmol/L από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1.02 pmol από τον κάθε εκκινητή, 1.52 mmol/L MgCl₂ και 0.04 U/μL του ενζύμου Taq πολυμεράση. Ο τελικός όγκος του μείγματος της αντίδρασης ήταν 30 μL. Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου της αντίδρασης PCR (αποδιάταξη, υβριδισμός, επιμήκυνση).

<u>ΕΞΟΝΙΟ</u>	<u>ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR</u>
2	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 62 °C για 60 sec, 72 °C για 30 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
3-4	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 31 κύκλους (94 °C για 30 sec, 62 °C για 60 sec, 72 °C για 60 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
5-6	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 31 κύκλους (94 °C για 30 sec, 64 °C για 60 sec, 72 °C για 60 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
7	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 31 κύκλους (94 °C για 30 sec, 62 °C για 60 sec, 72 °C για 40 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
8	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 33 κύκλους (94 °C για 30 sec, 64 °C για 60 sec, 72 °C για 30 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
9	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 31 κύκλους (94 °C για 30 sec, 63 °C για 60 sec, 72 °C για 30 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min
10	94 °C για 2 min, ακολουθούμενη από 31 κύκλους (94 °C για 30 sec, 60 °C για 60 sec, 72 °C για 45 sec) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Συνθήκες PCR για την ενίσχυση εκφραζόμενων περιοχών του γονιδίου *ACVRL1*.

3.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *ENG* ΚΑΙ *ACVRL1* ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρησή σε γέλη αгарόζης 2%. Για να γίνει δυνατή η απεικόνιση των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (5 μ L δείγματος, 1 μ L χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της γέλης αгарόζης και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30 min. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Η απεικόνιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Israel) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems).



Εικόνα 3: Παρουσιάζεται το αποτέλεσμα μιας αντιπροσωπευτικής ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR για το εξόνιο 4 του γονιδίου *ENG*.

3.4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *ENG* ΚΑΙ *ACVRL1*

Μετά την ενίσχυση των εκφραζόμενων περιοχών των γονιδίων *ENG* και *ACVRL1*, ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων PCR με τη χρήση του εμπορικού κιτ GRS PCR AND GEL BAND PURIFICATION KIT (Grisp), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR αποσκοπεί στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων. Βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο. Η διαδικασία περιλαμβάνει την προσθήκη καθαρού αποσταγμένου ύδατος σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR σε όγκο διπλάσιο από τον αρχικό όγκο (π.χ. σε όγκο PCR προϊόντος 25μL προστίθεται αποσταγμένο νερό 25μL, με τελικό όγκο 50μL). Έπειτα, προστίθεται NTI Buffer σε όγκο διπλάσιο από τον τελικό όγκο του διαλύματος, άρα 100μL και ακολουθεί ήπια ανάδευση και κατόπιν μεταφορά σε ειδικές στήλες με ειδικά σωληνάρια αποθήκευσης για την προσρόφηση του DNA. Μετά από φυγοκέντρηση στις 11.000 x g για 30 sec και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης, ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 700 μL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (NT3 Buffer). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11.000 x g για 30 sec και έπειτα ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση (11.000 x g για 1 min) χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την στήλη. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 22 μL διαλύματος έκλουσης και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 x g για 1 min. Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR ανακτώνται σε τελικό όγκο περίπου 28 μL, ενώ αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση τους.

3.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *ENG* ΚΑΙ *ACVRL1* ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ SANGER

Η μέθοδος Sanger είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA που βασίζεται στην τυχαία ενσωμάτωση τερματικών διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs) από την DNA πολυμεράση κατά την *in vitro* αντιγραφή του DNA. Ανακαλύφθηκε το 1977 από τον Frederick Sanger και για αρκετές δεκαετίες ήταν ο

κυριότερος τρόπος αλληλούχησης μέχρι την εμφάνιση των πιο σύγχρονων τεχνικών των τελευταίων δυο δεκαετιών. Τα ‘καθαρισμένα’ προϊόντα PCR των γονιδίων *ENG* και *ACVRL1* αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τον γενετικό αναλυτή ABI Prism310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και το συνοδό του Big Dye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems). Για την μελέτη των αλληλουχιών με στόχο την ανάδειξη τυχόν μεταλλάξεων ή και πολυμορφισμών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DNA Sequencing Analysis software, version 3.4 (Applied Biosystems) (40).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία που πληρούσαν τα κριτήρια Curaçao και παρακολουθούνταν στο εξωτερικό ιατρείο του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας. Πιο συγκεκριμένα, εντάχθηκαν δύο άντρες ασθενείς.

Ο πρώτος ασθενής διαγνώστηκε με την νόσο σε ηλικία 30 ετών. Κύρια χαρακτηριστικά από το ιστορικό του, κατά την στιγμή της διάγνωσης, αποτελούσαν οι επαναλαμβανόμενες ρινορραγίες και εντερορραγίες καθώς και οι χαρακτηριστικές αγγειακές βλάβες περίξ της γλώσσας. Από τον εργαστηριακό έλεγχο, ο ασθενής εμφάνιζε σιδηροπενική αναιμία και θρομβοπενία. Αξίζει ακόμη να αναφερθεί ότι ο ασθενής διαθέτει μια κόρη με την ίδια συμπτωματολογία. Στην παρούσα φάση λαμβάνει θαλιδομίδη με καλή ανταπόκριση.

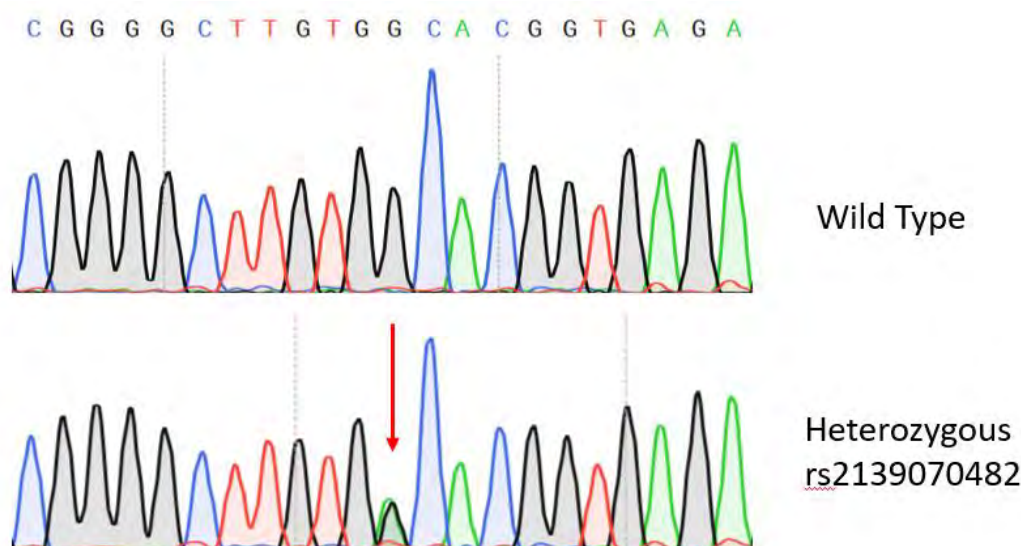
Ο δεύτερος ασθενής, ηλικίας 50 ετών, διαγνώστηκε με την νόσο σε παιδική ηλικία. Κύρια ευρήματα που έθεσαν την υποψία της νόσου ήταν οι ρινορραγίες και το θετικό οικογενειακό ιστορικό (η αδερφή του εμφάνιζε αιμορραγικές εκδηλώσεις και τελαγγειεκτασίες). Στην παρούσα φάση λαμβάνει λεναλιδομίδη με καλή ανταπόκριση.

4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλληλούχιση των εξονίων των γονιδίων *ENG* και *ACVRL1* τέθηκαν σε σύγκριση με τις αλληλουχίες των γονιδίων, όπως αυτές περιγράφονται στην Ensembl. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ανάλυσης αλληλουχιών SnapGene Viewer 4.1 και αναδείχθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα ανά ασθενή:

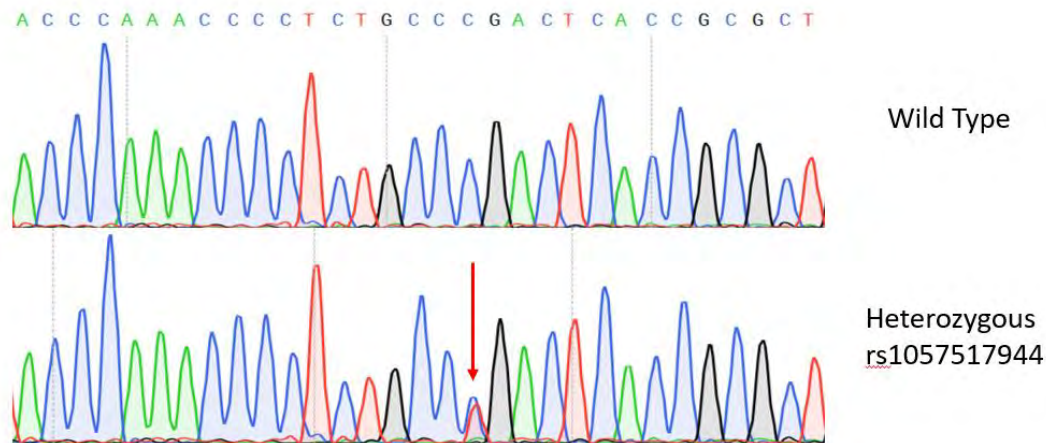
Στον πρώτο ασθενή ανιχνεύσαμε την βλάβη rs2139070482 στο εξόνιο 7 του γονιδίου *ACVRL1*. Πρόκειται για τη μετάλλαξη NM_000020.3 (*ACVRL1*):c.663G>A (p.Trp221Ter), η οποία σύμφωνα με διεθνείς βάσεις, όπως η clinVAR, χαρακτηρίζεται

ως παθογόνος. Πιο αναλυτικά, η συγκεκριμένη σημειακή βλάβη χαρακτηρίζεται από την αλλαγή μιας βάσης γουανίνης σε αδενίνη στην θέση 663 του γονιδίου με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης και την παραγωγή μιας μικρότερης μη λειτουργικής πεπτιδικής αλυσίδας. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν παρατηρήθηκε κάποια άλλη γενετική βλάβη στα υπόλοιπα εξόνια του γονιδίου. Ακολουθεί η απεικόνιση της γενετικής βλάβης του ασθενή.



Εικόνα 4: Ηλεκτροφορόγραμμα αποτελέσματος ασθενούς ετερόζυγου για την γενετική βλάβη rs2139070482.

Στον δεύτερο ασθενή ανιχνεύσαμε την βλάβη rs1057517944 στο εξόνιο 11 του γονιδίου *ACVRL1*. Πρόκειται για τη μετάλλαξη NM_000020.3(*ACVRL1*):c.1435C>T (p.Arg479Ter) η οποία χαρακτηρίζεται ως παθογόνος από διεθνείς βάσεις όπως η clinVAR. Η συγκεκριμένη σημειακή βλάβη χαρακτηρίζεται από την αλλαγή μιας βάσης κυτοσίνης σε θυμίνη στην θέση 1435 του γονιδίου με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης και την παραγωγή μιας μικρότερης μη λειτουργικής πεπτιδικής αλυσίδας. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν παρατηρήθηκε κάποια άλλη γενετική βλάβη στα υπόλοιπα εξόνια του γονιδίου. Ακολουθεί η απεικόνιση της γενετικής βλάβης του ασθενή.



Εικόνα 5: Ηλεκτροφερόγραμμα αποτελέσματος ασθενούς ετερόζυγου για την γενετική βλάβη rs1057517944.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία είναι νόσος που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι του TGF- β , το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενδοθηλιακή ομοιοστασία (41). Τα πλέον μελετημένα γονίδια τα οποία είναι γνωστό ότι ενοχοποιούνται για την εμφάνιση της νόσου είναι τα γονίδια *ENG*, *ACVRL1*, *MADH4* και *GDF2* τα οποία κωδικοποιούν τον υποδοχέα της ενδογλίνης, τον υποδοχέα ALK1, τον ενδοκυττάριο μεσολαβητή SMAD4 και τον συνδέτη BMP-9, αντίστοιχα. Στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, μόρια BMP-9 συνδέονται με ετεροδιμερή που σχηματίζονται από τους υποδοχείς ενδογλίνης και ALK1 (42,43). Μετά την σύζευξη, ο υποδοχέας της ενδογλίνης φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα ALK1 και ακολούθως ο υποδοχέας ALK1 φωσφορυλιώνει το σύμπλοκο μεταγραφικών παραγόντων SMAD1/5. Το σύμπλοκο SMAD1/5 συνδέεται με μόρια SMAD4. Το σύμπλεγμα SMAD1/5/4 εισέρχεται στον πυρήνα και ελέγχει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ομοιοστασία των ενδοθηλιακών κυττάρων (41,44). Η ‘υπολειτουργία του άξονα’ λόγω μεταλλάξεων απλοανεπάρκειας επιτρέπει την ενεργοποίηση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως του VEGF, τα οποία οδηγούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και εμφάνιση της νόσου.

Στην δικιά μας μελέτη, εντάξαμε 2 ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία, οι οποίοι παρακολουθούνταν στο εξωτερικό ιατρείο του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας. Τα ευρήματα της γενετικής ανάλυσης, επιβεβαίωσαν τα ήδη γνωστά δεδομένα της βιβλιογραφίας. Και οι δυο ασθενείς εμφάνιζαν μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα ALK1. Ο πρώτος ασθενής εμφάνιζε την μετάλλαξη NM_000020.3 (*ACVRL1*):c.663G>A (p.Trp221Ter) ενώ ο δεύτερος την μετάλλαξη NM_000020.3 (*ACVRL1*):c.1435C>T (p.Arg479Ter). Πρόκειται για μεταλλάξεις που οδηγούν σε πρόωρη εμφάνιση ενός κωδικονίου λήξης και στην παραγωγή μιας μικρότερης μη λειτουργικής πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Η μετάλλαξη NM_000020.3 (*ACVRL1*):c.663G>A (p.Trp221Ter) έχει περιγραφεί από την Ana Fontalba και τους συνεργάτες της (45). Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα ανέλυσε γενετικά οικογένειες με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία από την Ισπανία. Ανίχνευσαν την μετάλλαξη c.663G>A σε 2 μέλη μιας οικογένειας τα οποία εμφάνιζαν ηπατικές αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις. Σε αντίθεση με την μετάλλαξη που ανιχνεύσαμε στον πρώτο ασθενή, η οποία είναι πιο σπάνια, η μετάλλαξη NM_000020.3 (*ACVRL1*):c.1435C>T (p.Arg479Ter) που εντοπίσαμε στον δεύτερο ασθενή έχει περιγραφεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες (14,46,47). Αξίζει να αναφερθεί πως για την πρώτη μετάλλαξη υπάρχει μόλις μια καταχώρηση στην διεθνή βάση καταχώρησης ClinVar ενώ για την δεύτερη έχουν γίνει 5 καταχωρήσεις. Ακόμη, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν έχουν περιγραφεί σε ασθενείς του ελληνικού χώρου.

Η κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία είναι μια σπάνια αγγειοπάθεια που χαρακτηρίζεται από δύσμορφες αρτηρίες, φλέβες και τριχοειδή καθώς και ‘ανώμαλες’ επικοινωνίες μεταξύ αυτών (48). Με βάση το μέγεθος των εμπλεκόμενων αγγείων μπορούν να διακριθούν δυο τύποι αγγειακών αλλοιώσεων, οι τελαγγειεκτασίες και οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις. Ιστολογικά, η εξελικτική ανάπτυξη τόσο των τελαγγειεκτασιών όσο και των αρτηριοφλεβωδών αναστομώσεων περιγράφηκε για πρώτη φορά σε βιοψίες από τον Braverman και τους συνεργάτες του (49). Οι τελαγγειεκτασίες παρατηρούνται συχνότερα κατά μήκος των βλεννογόνων και συχνότερα εμφανίζονται στις ράγες των δακτύλων, στα χέρια, στα χείλη, στην γλώσσα, στην ρινική κοιλότητα καθώς και κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα (50,51). Οι βλάβες είναι τυπικά μικρές, ερυθρές και επίπεδες ή ελαφρώς επηρμένες. Οι

τελαγγειεκτασίες της ρινικής κοιλότητας είναι υπεύθυνες για αυτόματα και υποτροπιάζουσα επεισόδια ρινορραγιών τα οποία οδηγούν σε σιδηροπενική αναιμία στο 50% περίπου των ασθενών (52). Αντίστοιχα, οι τελαγγειεκτασίες του γαστρεντερικού σωλήνα μπορεί να οδηγήσουν σε αιμορραγία ανώτερου ή κατώτερου πεπτικού. Σε αντίθεση, οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις παρατηρούνται σε συμπαγή όργανα όπως στους πνεύμονες, στο ήπαρ και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Συχνά, με την πάροδο των χρόνων αυξάνονται σε μέγεθος και προκαλούν απειλητικές για την ζωή επιπλοκές. Οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις του πνεύμονα μπορούν να οδηγήσουν σε αιμορραγία/αιμόπτυση λόγω ρήξης ή σε υποξαιμία λόγω αυξημένης διαφυγής αίματος (53). Οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις ήπατος μπορεί να οδηγήσουν σε καρδιακή ανεπάρκεια, πυλαία υπέρταση καθώς και ισχαιμία χοληφόρων αγγείων (54). Αντιθέτως, οι αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι πιο σπάνιες και συνήθως παραμένουν ασυμπτωματικές. Για τον λόγο αυτό προτείνεται η τακτική παρακολούθηση του μεγέθους τους με απεικονιστικές εξετάσεις και η παρέμβαση επί συγκεκριμένων ενδείξεων (55).

Ο τύπος κληρονομικότητας της κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας καθώς και δεδομένα από λειτουργικές μελέτες οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η νόσος οφείλεται σε απλοανεπάρκεια των προϊόντων των εμπλεκόμενων γονιδίων. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από μελέτες που έδειξαν ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα της της ενδογλίνης είναι μειωμένα σε ενδοθηλιακά κύτταρα ασθενών με HHT1 υπότυπο της νόσου ενώ ταυτόχρονα τα επίπεδα του ALK1 υποδοχέα είναι μειωμένα σε ασθενείς με HHT2 υπότυπο της νόσου. Ωστόσο, το μοντέλο της απλοανεπάρκειας δεν ερμηνεύει τον λόγο για τον οποίο οι αγγειακές βλάβες είναι εντοπισμένες παρά το γεγονός ότι την γενετική βλάβη φέρουν όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα (27). Ακόμη, το μοντέλο της απλοανεπάρκειας αδυνατεί να ερμηνεύσει την ετερογένεια που παρατηρείται ακόμα και σε μέλη μιας οικογένειας που φέρουν την ίδια γενετική βλάβη. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην ανάπτυξη της θεωρίας του ‘δεύτερου χτυπήματος’. Σύμφωνα με αυτήν, ο συνδυασμός της πρωτογενούς γενετικής βλάβης μαζί με κάποιον άλλο γενετικό, περιβαλλοντικό ή τοπικό παράγοντα οδηγεί στην εμφάνιση των αγγειακών βλαβών (56).

Η θεωρία του ‘δεύτερου χτυπήματος’ ενισχύεται από μια σειρά πειραματικών μελετών. Για παράδειγμα, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ενδοκρανιακή χορήγηση αυξητικού παράγοντα VEGF σε *ENG* +/- ή *ALK1* +/- ποντίκια οδηγούσε στην εμφάνιση

αρτηριοφλεβωδών αναστομώσεων κεντρικού νευρικού συστήματος, γεγονός που δεν συνέβαινε στα ποντίκια αγρίου τύπου (57,58). Επιπλέον, μια μελέτη 103 ασθενών με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία έδειξε ότι ο αριθμός των τελαγγειεκτασιών ήταν μεγαλύτερος στο κυρίαρχο άνω άκρο και το κάτω χέιλος των ασθενών. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι αυτό συνέβαινε λόγω της αυξημένης μηχανικής πίεσης που δέχονται αυτά τα σημεία του σώματος (59). Επίσης ο αριθμός των τελαγγειεκτασιών στα χείλη ήταν μεγαλύτερος σε ασθενείς με μεγαλύτερη έκθεση στον ήλιο. Μια άλλη μελέτη από τον Snellings και τους συνεργάτες του έδειξε ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα τελαγγειεκτασιών ασθενών με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία φέρουν επιπρόσθετες σωματικές μεταλλάξεις υποδηλώνοντας έτσι ότι το ‘δεύτερο χτύπημα’ μπορεί να είναι και γενετικής φύσεως (60).

Τις τελευταίες δεκαετίες οι θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία έχουν αυξηθεί σημαντικά. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της νόσου βοήθησε τους επιστήμονες να αναπτύξουν φάρμακα τα οποία εκλεκτικά στοχεύουν συγκεκριμένα μόρια και μεταβολικά μονοπάτια. Ένα από αυτά είναι το Bevacizumab το οποίο άλλαξε δραματικά την κλινική πορεία των ασθενών. Μετά την επιτυχία αυτού, αρκετά αντι-αγγειογενετικά φάρμακα, τα οποία αρχικά αναπτύχθηκαν για τους ογκολογικούς ασθενείς, ελέγχθηκαν για πιθανή αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία (61–72). Στον πίνακα 5 που ακολουθεί συνοψίζονται τα κυριότερα μόρια τα οποία έως σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί σε προ-κλινικές και κλινικές μελέτες μαζί με τον μηχανισμό δράσης τους και μέλει να φανεί η πιθανή αξία τους.

Δραστική Ουσία	Μηχανισμός Δράσης
Pazopanib	Αναστολέας Τυροσινικής Κινάσης
Sorafenib	Αναστολέας Τυροσινικής Κινάσης
Nintedanib	Αναστολέας Τυροσινικής Κινάσης
Wortmannin	Αναστολείς PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) and AKT (Protein kinase B)
Pictilisib	Αναστολείς PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) and AKT (Protein kinase B)
Thalidomide	IMiDs (Immunomodulatory drugs)

lenalidomide	IMiDs (Immunomodulatory drugs)
Pomalidomide	IMiDs (Immunomodulatory drugs)
Palbociclib	CDK (Cyclin-dependent kinase) 4/6 αναστολέας
Sirolimus	mTOR (Mammalian target of rapamycin) αναστολέας

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Φαρμακευτικές ουσίες με δράση έναντι της αγγειογένεσης οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί σε προκλινικές και κλινικές μελέτες για την κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία (73).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η αποτελεσματικότητα του Bevacizumab έδειξε ότι το μονοπάτι του VEGF αποτελεί έναν τελέσφορο τρόπο για την αναχαίτιση της αγγειογένεσης που παρατηρείται στους ασθενείς με κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία. Ωστόσο, το μεταβολικό μονοπάτι του VEGF είναι σύνθετο και ρυθμίζει την λειτουργία πολλών άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Ενδέχεται, λοιπόν, η εκλεκτική αναστολή μορίων τα οποία ρυθμίζονται από τον VEGF να έχει εξίσου ενθαρρυντικά αποτελέσματα με το Bevacizumab με λιγότερη τοξικότητα.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία είναι μια σπάνια αγγειοπάθεια που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση τελαγγειεκτασιών, αρτηριοφλεβωδών αναστομώνσεων καθώς και αιμορραγικών εκδηλώσεων. Εντατικές ερευνητικές προσπάθειες των τελευταίων δεκαετιών οδήγησαν στην αποσαφήνιση των γενετικών αιτιών που οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου. Είναι καθολικά αποδεκτό πως μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται στην ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- β προκαλούν την νόσο. Στην μελέτη μας, αναλύσαμε γενετικά 2 ασθενείς με κλινική εικόνα κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας. Τόσο στον πρώτο όσο και στον δεύτερο ασθενή, ανιχνεύσαμε παθογόνες μεταλλάξεις στα εξόνια 7 και 11 του γονιδίου *ACVRL1*, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας τα ήδη γνωστά για την νόσο. Η ανάδειξη της γενετικής βλάβης που αιτιολογεί το σύνδρομο της κληρονομικής αιμορραγικής τελαγγειεκτασίας είναι σημαντική για την γενετική συμβουλευτική οικογενειών, καθώς δίνεται η δυνατότητα της έγκαιρης διάγνωσης για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sabbà C, Gallitelli M, Pasculli G, Suppressa P, Resta F, Tafaro GE. HHT: a rare disease with a broad spectrum of clinical aspects. *Curr Pharm Des.* 2006;12(10):1217–20.
2. Parrot A, Barral M, Amiot X, Bachmeyer C, Wagner I, Eyries M, et al. [Hereditary hemorrhagic telangiectasia]. *Rev Mal Respir.* 2023 Dec;40(5):391–405.
3. Juares AJC, Dell’Aringa AR, Nardi JC, Kobari K, Rodrigues VLMGM, Filho RMP. Rendu-Osler-Weber Syndrome: case report and literature review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2015 Oct 19;74(3):452–7.
4. Fuchizaki U, Miyamori H, Kitagawa S, Kaneko S, Kobayashi K. Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease). *Lancet.* 2003 Nov 1;362(9394):1490–4.
5. Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 1995 Oct 5;333(14):918–24.
6. Haitjema T, Westermann CJ, Overtom TT, Timmer R, Disch F, Mauser H, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu disease): new insights in pathogenesis, complications, and treatment. *Arch Intern Med.* 1996 Apr 8;156(7):714–9.
7. Bayrak-Toydemir P, Mao R, Lewin S, McDonald J. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an overview of diagnosis and management in the molecular era for clinicians. *Genet Med.* 2004;6(4):175–91.
8. AAssar OS, Friedman CM, White RI. The natural history of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope.* 1991 Sep;101(9):977–80.
9. Porteous ME, Burn J, Proctor SJ. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical analysis. *J Med Genet.* 1992 Aug;29(8):527–30.
10. Kritharis A, Al-Samkari H, Kuter DJ. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: diagnosis and management from the hematologist’s perspective. *Haematologica.* 2018 Sep;103(9):1433–43.
11. Vase P, Holm M, Arendrup H. Pulmonary arteriovenous fistulas in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Acta Med Scand.* 1985;218(1):105–9.
12. Brydon HL, Akinwunmi J, Selway R, Ul-Haq I. Brain abscesses associated with pulmonary arteriovenous malformations. *Br J Neurosurg.* 1999 Jun;13(3):265–9.
13. Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, et al. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet.* 2000 Mar 6;91(1):66–7.
14. Letteboer TGW, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet.* 2005 Jan;116(1–2):8–16.
15. McDonald J, Woodechak-Donahue W, VanSant Webb C, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet.* 2015;6:1.

16. Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet*. 2004 Mar 13;363(9412):852–9.
17. Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, et al. Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet*. 2000 Dec 1;9(8):1227–37.
18. Lesca G, Burnichon N, Raux G, Tosi M, Pinson S, Marion MJ, et al. Distribution of ENG and ACVRL1 (ALK1) mutations in French HHT patients. *Hum Mutat*. 2006 Jun;27(6):598.
19. McDonald J, Damjanovich K, Millson A, Wooderchak W, Chibuk JM, Stevenson DA, et al. Molecular diagnosis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: findings in a series tested simultaneously by sequencing and deletion/duplication analysis. *Clin Genet*. 2011 Apr;79(4):335–44.
20. Damjanovich K, Langa C, Blanco FJ, McDonald J, Botella LM, Bernabeu C, et al. 5'UTR mutations of ENG cause hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2011 Dec 22;6:85.
21. Wooderchak-Donahue WL, McDonald J, O'Fallon B, Upton PD, Li W, Roman BL, et al. BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet*. 2013 Sep 5;93(3):530–7.
22. Wain KE, Ellingson MS, McDonald J, Gammon A, Roberts M, Pichurin P, et al. Appreciating the broad clinical features of SMAD4 mutation carriers: a multicenter chart review. *Genet Med*. 2014 Aug;16(8):588–93.
23. Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grünig E, Aldred M, Geraci M, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Dec 24;62(25 Suppl):D13–21.
24. Williams JCB, Hamilton JK, Shiller M, Fischer L, dePrisco G, Boland CR. Combined juvenile polyposis and hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2012 Oct;25(4):360–4.
25. Al-Samkari H. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: systemic therapies, guidelines, and an evolving standard of care. *Blood*. 2021 Feb 18;137(7):888–95.
26. Wirsching KEC, Kühnel TS. Update on Clinical Strategies in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia from an ENT Point of View. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2017 Jun;10(2):153–7.
27. Faughnan ME, Mager JJ, Hetts SW, Palda VA, Lang-Robertson K, Buscarini E, et al. Second International Guidelines for the Diagnosis and Management of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Ann Intern Med*. 2020 Dec 15;173(12):989–1001.
28. Saboo SS, Chamrath M, Bhalla S, Park H, Sutphin P, Kay F, et al. Pulmonary arteriovenous malformations: diagnosis. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2018 Jun;8(3):325–37.
29. Jackson SB, Villano NP, Benhammou JN, Lewis M, Pisegna JR, Padua D. Gastrointestinal Manifestations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT): A Systematic Review of the Literature. *Dig Dis Sci*. 2017 Oct;62(10):2623–30.

30. Brain Arteriovenous Malformation Multiplicity Predicts the Diagnosis of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia | Stroke [Internet]. [cited 2024 Jul 17]. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.111.629865>
31. Gaillard S, Dupuis-Girod S, Boutitie F, Rivière S, Morini re S, Hatron PY, et al. Tranexamic acid for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia patients: a European cross-over controlled trial in a rare disease. *J Thromb Haemost*. 2014 Sep;12(9):1494–502.
32. Andorfer KEC, Zeman F, Koller M, Zeller J, Fischer R, Seebauer CT, et al. TIMolol Nasal Spray as a Treatment for Epistaxis in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (TIM-HHT)—A Prospective, Randomized, Double-Blind, Controlled, Cross-Over Trial. *Pharmaceutics*. 2022 Oct 29;14(11):2335.
33. Esteban-Casado S, Martín de Rosales Cabrera AM, Usarralde Pérez A, Martínez Simón JJ, Zhan Zhou E, Marcos Salazar MS, et al. Sclerotherapy and Topical Nasal Propranolol: An Effective and Safe Therapy for HHT-Epistaxis. *Laryngoscope*. 2019 Oct;129(10):2216–23.
34. Luk L, Mace JC, Bhandarkar ND, Sautter NB. Comparison of electrosurgical plasma coagulation and potassium-titanyl-phosphate laser photocoagulation for treatment of hereditary hemorrhagic telangiectasia-related epistaxis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014 Aug;4(8):640–5.
35. van Gent MWF, Post MC, Luermans JGLM, Snijder RJ, Westermann CJJ, Plokker HWM, et al. Screening for pulmonary arteriovenous malformations using transthoracic contrast echocardiography: a prospective study. *Eur Respir J*. 2009 Jan;33(1):85–91.
36. Tellapuri S, Park HS, Kalva SP. Pulmonary arteriovenous malformations. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2019 Aug;35(8):1421–8.
37. Albi ana V, Giménez-Gallego G, García-Mato A, Palacios P, Recio-Poveda L, Cuesta AM, et al. Topically Applied Etamsylate: A New Orphan Drug for HHT-Derived Epistaxis (Antiangiogenesis through FGF Pathway Inhibition). *TH Open*. 2019 Jul;3(3):e230–43.
38. Viteri-No l A, González-García A, Patier JL, Fabregate M, Bara-Ledesma N, López-Rodríguez M, et al. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Genetics, Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *J Clin Med*. 2022 Sep 5;11(17):5245.
39. Kim YH, Kim MJ, Choe SW, Sprecher D, Lee YJ, P Oh S. Selective effects of oral antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors on an animal model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Thromb Haemost*. 2017 Jun;15(6):1095–102.
40. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, Iordanakis G, Liadaki K, Bardaka F, et al. TNFRSF13B/TACI alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *J Clin Immunol*. 2011 Aug;31(4):550–9.
41. Desroches-Castan A, Tillet E, Bouvard C, Bailly S. BMP9 and BMP10: Two close vascular quiescence partners that stand out. *Dev Dyn*. 2022 Jan;251(1):178–97.
42. Lawera A, Tong Z, Thorikay M, Redgrave RE, Cai J, van Dinther M, et al. Role of soluble endoglin in BMP9 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Sep 3;116(36):17800–8.

43. Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci.* 2007 Mar 15;120(Pt 6):964–72.
44. ALK1 signaling in development and disease: new paradigms - PubMed [Internet]. [cited 2024 Aug 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28871312/>
45. Fontalba A, Fernandez-L A, García-Alegria E, Albiñana V, Garrido-Martin EM, Blanco FJ, et al. Mutation study of Spanish patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *BMC Med Genet.* 2008 Aug 1;9:75.
46. Lesca G, Plauchu H, Coulet F, Lefebvre S, Plessis G, Odent S, et al. Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat.* 2004 Apr;23(4):289–99.
47. Abdalla SA, Gallione CJ, Barst RJ, Horn EM, Knowles JA, Marchuk DA, et al. Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Respir J.* 2004 Mar;23(3):373–7.
48. Wassef M, Blei F, Adams D, Alomari A, Baselga E, Berenstein A, et al. Vascular Anomalies Classification: Recommendations From the International Society for the Study of Vascular Anomalies. *Pediatrics.* 2015 Jul;136(1):e203-214.
49. Braverman IM, Keh A, Jacobson BS. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol.* 1990 Oct;95(4):422–7.
50. McDonald J, Kornish J, Stevenson DA, Hanson-Kahn A, Balch H, James J, et al. Frequency of epistaxis and telangiectasia in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) in comparison with the general population: Curaçao diagnostic criteria revisited. *Genet Med.* 2023 Aug;25(8):100865.
51. Hyldahl SJ, El-Jaji MQ, Schuster A, Kjeldsen AD. Skin and mucosal telangiectatic lesions in hereditary hemorrhagic telangiectasia patients. *Int J Dermatol.* 2022 Dec;61(12):1497–505.
52. Kasthuri RS, Montifar M, Nelson J, Kim H, Lawton MT, Faughnan ME, et al. Prevalence and predictors of anemia in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hematol.* 2017 Jun 22;
53. Dupuis-Girod S, Cottin V, Shovlin CL. The Lung in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Respiration.* 2017;94(4):315–30.
54. Buscarini E, Gandolfi S, Alicante S, Londoni C, Manfredi G. Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Abdom Radiol (NY).* 2018 Aug;43(8):1920–30.
55. Eker OF, Boccardi E, Sure U, Patel MC, Alicante S, Alsafi A, et al. European Reference Network for Rare Vascular Diseases (VASCERN) position statement on cerebral screening in adults and children with hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT). *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Jun 29;15(1):165.
56. Bernabeu C, Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Letarte M. Potential Second-Hits in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *J Clin Med.* 2020 Nov 5;9(11):3571.

57. Xu B, Wu YQ, Huey M, Arthur HM, Marchuk DA, Hashimoto T, et al. Vascular endothelial growth factor induces abnormal microvasculature in the endoglin heterozygous mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Feb;24(2):237–44.
58. Hao Q, Zhu Y, Su H, Shen F, Yang GY, Kim H, et al. VEGF Induces More Severe Cerebrovascular Dysplasia in Endoglin than in Alk1 Mice. *Transl Stroke Res.* 2010 Sep 1;1(3):197–201.
59. Geisthoff U, Nguyen HL, Lefering R, Maune S, Thangavelu K, Droege F. Trauma Can Induce Telangiectases in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *J Clin Med.* 2020 Dec 17;9(5):1507.
60. Somatic Mutations in Vascular Malformations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Result in Bi-allelic Loss of ENG or ACVRL1 - PubMed [Internet]. [cited 2024 Aug 2]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31630786/>
61. Lebrin F, Srun S, Raymond K, Martin S, van den Brink S, Freitas C, et al. Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat Med.* 2010 Apr;16(4):420–8.
62. Walker EJ, Su H, Shen F, Degos V, Amend G, Jun K, et al. Bevacizumab attenuates VEGF-induced angiogenesis and vascular malformations in the adult mouse brain. *Stroke.* 2012 Jul;43(7):1925–30.
63. Han C, Choe SW, Kim YH, Acharya AP, Keselowsky BG, Sorg BS, et al. VEGF neutralization can prevent and normalize arteriovenous malformations in an animal model for hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. *Angiogenesis.* 2014 Oct;17(4):823–30.
64. Thalgott JH, Dos-Santos-Luis D, Hosman AE, Martin S, Lamandé N, Bracquart D, et al. Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Contributes to the Pathogenesis of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 2. *Circulation.* 2018 Dec 4;138(23):2698–712.
65. Ola R, Dubrac A, Han J, Zhang F, Fang JS, Larrivée B, et al. PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nat Commun.* 2016 Nov 29;7:13650.
66. Chavan A, Schumann-Binarsch S, Luthe L, Nickau B, Elsässer A, Kühnel T, et al. Systemic therapy with bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *Vasa.* 2013 Mar;42(2):106–10.
67. Villanueva B, Iriarte A, Torres-Iglesias R, Muñoz Bolaño M, Cerdà P, Riera-Mestre A. Afibercept for Gastrointestinal Bleeding in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: A Case Report. *Medicina (Kaunas).* 2023 Aug 24;59(9):1533.
68. Faughnan ME, Gossage JR, Chakinala MM, Oh SP, Kasthuri R, Hughes CCW, et al. Pazopanib may reduce bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Angiogenesis.* 2019 Feb;22(1):145–55.
69. Kovacs-Sipos E, Holzmann D, Scherer T, Soyka MB. Nintedanib as a novel treatment option in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *BMJ Case Rep.* 2017 Jun 26;2017:bcr2017219393, bcr-2017–219393.

70. Pruijsen JM, Kroon S, Mager JJ, Bungener LB, van der Doef HPJ. Tacrolimus in Gastrointestinal Bleeding in a Young Boy With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *JPGN Rep.* 2021 Nov;2(4):e133.
71. Dupuis-Girod S, Ginon I, Saurin JC, Marion D, Guillot E, Decullier E, et al. Bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and severe hepatic vascular malformations and high cardiac output. *JAMA.* 2012 Mar 7;307(9):948–55.
72. Al-Samkari H, Kasthuri RS, Parambil JG, Albitar HA, Almodallal YA, Vázquez C, et al. An international, multicenter study of intravenous bevacizumab for bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia: the InHIBIT-Bleed study. *Haematologica.* 2021 Aug 1;106(8):2161–9.
73. Al Tabosh T, Al Tarrass M, Tourvieilhe L, Guilhem A, Dupuis-Girod S, Bailly S. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: from signaling insights to therapeutic advances. *J Clin Invest.* 134(4):e176379.