

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ ΤΡΥΠΟΣΚΙΑΔΗΣ

---

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2008-09

ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ  
ΣΤΑ ΟΞΕΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗΣ  
*Ιατρός*

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ****ΦΙΛΙΠΠΟΣ ΤΡΥΠΟΣΚΙΑΔΗΣ***Καθηγητής Καρδιολογίας, Επιβλέπων Καθηγητής***ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΚΟΥΛΑΡΙΓΚΗΣ***Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας***ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ***Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας***ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ****ΦΙΛΙΠΠΟΣ ΤΡΥΠΟΣΚΙΑΔΗΣ***Καθηγητής Καρδιολογίας, Επιβλέπων Καθηγητής***ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΚΟΥΛΑΡΙΓΚΗΣ***Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας***ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ***Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας***ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ***Καθηγητής Πνευμονολογίας***ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΓΙΑΝΝΟΥΚΑΣ***Αναπληρωτής Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής***ΛΑΖΑΡΟΣ ΣΑΚΚΑΣ***Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας***ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ***Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής*

*στη σύζυγό μου Σίσσυ*

*στους γονείς μου Κώστα και Παρούλα*

*για την αμέριστη συμπαράσταση και την ανεξάντλητη υπομονή*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τη διατριβή αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίησή της.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Φίλιππο Τρυποσκιάδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την παρούσα διατριβή. Στο πλαίσιο αυτής και καθ' όλη τη διάρκεια των προηγούμενων ετών αποτέλεσε για μένα πηγή επιστημονικής γνώσης και καθοδήγησης και πρότυπο ιατρικής σκέψης.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Σκουλαρίγκη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Στεφανίδη για την εμπιστοσύνη και συμπαράστασή τους ως μέλη της Τριμελούς Επιτροπής κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα. Ασπασία Τσέζου, της οποίας ο ρόλος στο σχεδιασμό, στην οργάνωση και στην επιτέλεση των γενετικών αναλύσεων ήταν θεμελιώδους σημασίας για την καθεαυτή ύπαρξη της παρούσας διατριβής. Επίσης, την ευχαριστώ για το ότι με εισήγαγε επιστημονικά στον κόσμο της Γενετικής, ενός πεδίου άγνωστου σε μένα, μέσα από πολύτιμες συμβουλές και καίριες επισημάνσεις.

Ευχαριστώ την Ειρήνη Γιαννάτου που αφιέρωσε σημαντικό μέρος του πολύτιμου χρόνου της για τη διενέργεια της τελικής επεξεργασίας των γενετικών δειγμάτων.

Ευχαριστώ το σύνολο του προσωπικού του τμήματος Μοριακής Βιολογίας και ιδιαίτερα τον Βασίλη Παπανικολάου για την αδιάλειπτη υποστήριξη και βοήθεια στο πρακτικό κομμάτι της επεξεργασίας του γενετικού υλικού.

Τέλος, ευχαριστώ το σύνολο των συμμετεχόντων στη διατριβή που απέδειξαν ότι με τον εθελοντισμό κατακτάται και η επιστημονική γνώση.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Γεώργιος Καραγιάννης: Φλεγμονώδης αντίδραση και πολυμορφισμοί  
στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα

(Με την επίβλεψη του κ. Φίλιππου Τρυποσκιάδη, Καθηγητή Καρδιολογίας)

**Εισαγωγή.** Το σύστημα ρενίνης-αγγιοτενσίνης-αλδοστερόνης και το σύστημα των νατριουρητικών πεπτιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος. Συνεπώς, οι γενετικές παραλλαγές σε γονίδια που αφορούν τα παραπάνω συστήματα μπορεί να σχετίζονται με την ανάπτυξη και εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου (ΣΝ).

**Σκοπός.** Η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ του (CA)<sub>n</sub> πολυμορφισμού επανάληψης του γονιδίου του αγγιοτενσινογόνου (AGT), της προσθήκης/έλλειψης 250bp (I/D) του γονιδίου του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης (ACE), του τετρανουκλεοτιδικού πολυμορφισμού επανάληψης (TCTG)<sub>n</sub> του γονιδίου της ρενίνης (REN) και του πολυμορφισμού επανάληψης (CT)<sub>n</sub> του γονιδίου του υποδοχέα A των νατριουρητικών πεπτιδίων (NPRA) και της παρουσίας και έκτασης της ΣΝ σε 158 ασθενείς (ομάδα ΣΝ) με ιστορικό οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (OEM), καθώς και η συσχέτιση των παραπάνω πολυμορφισμών με τις συγκεντρώσεις της υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP).

**Μέθοδος και Αποτελέσματα.** Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από 144 παρόμοιας ηλικίας ενήλικες. Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν Ελληνικής καταγωγής. Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε στεφανιαία αγγειογραφία, με βάση τα αποτελέσματα της οποίας δημιουργήθηκαν 3 υποομάδες ανάλογα με τον αριθμό των αγγείων που εμφάνισαν στένωση του αυλού >50%: υποομάδα μη αποφρακτικών αλλοιώσεων ή ΣΝ 1 αγγείου, ΣΝ 2 αγγείων και ΣΝ 3 αγγείων (n=47, 51 και 60 αντίστοιχα). Τα αλληλία των AGT, REN και NPRA χαρακτηρίστηκαν ως βραχεία (short-S) ή μακρά (long-L) με όριο διαχωρισμού τη διάμεση τιμή. Ο SS γονότυπος του γονιδίου του AGT σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για ΣΝ 3 αγγείων τόσο μεταξύ των ασθενών

[σχετικός κίνδυνος (ΣΚ): 1.945, 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (ΔΕ): 1.006-3.762], όσο και σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (ΣΚ: 1.944, 1.047-3.609). Αντίθετα, ο SL γονότυπος σχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο. (ΣΚ: 0.449, 0.218-0.923 και 0.441, 0.223-0.874 αντίστοιχα). Ο SL γονότυπος του γονιδίου της REN σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση ΣΝ (ΣΚ: 2.183, 1.352-3.526), ενώ οι SS και LL γονότυποι εμφάνισαν προστατευτική επίδραση (ΣΚ: 0.554, 0.345-0.888 και 0.234, 0.055-0.996 αντίστοιχα). Ωστόσο, μετά από διόρθωση ως προς συνυπάρχοντες παράγοντες οι συσχετίσεις που πρόέκυψαν από σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων δε διατηρήθηκαν. Οι συγκεντρώσεις της hsCRP κατανεμήθηκαν παρόμοια μεταξύ των πολυμορφισμών και των ομάδων της μελέτης.

**Συμπεράσματα.** Για πρώτη φορά αναδείχθηκε μια σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού (CA)<sub>n</sub> του γονιδίου του AGT με την έκταση της ΣΝ σε ασθενείς Ελληνικής καταγωγής με ιστορικό OEM. Επιπλέον, ο πολυμορφισμός (TCTG)<sub>n</sub> του γονιδίου της REN μπορεί να σχετίζεται με την παρουσία ΣΝ.

*Λέξεις-κλειδιά:* οξέα στεφανιαία σύνδρομα, σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, σύστημα νατριουρητικών πεπτιδίων, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, γενετικοί πολυμορφισμοί

## ABSTRACT

Georgios Karayannis: Inflammation and polymorphisms  
in acute coronary syndromes

(Under the supervision of Filippos Triposkiadis, Professor of Cardiology)

**Background.** The renin-angiotensin-aldosterone and natriuretic peptide systems play an important role in cardiovascular physiology. Thus, variations in genes involved in the above systems may be candidates for the development and progression of coronary artery disease (CAD).

**Aim.** To assess the possible association between the (CA)<sub>n</sub> repeat polymorphism of angiotensinogen (AGT), the 250 bp insertion/deletion (I/D) of angiotensin-converting enzyme (ACE), the tetranucleotide repeat polymorphism (TCTG)<sub>n</sub> of renin (REN), the (CT)<sub>n</sub> repeat polymorphism of the natriuretic peptide receptor A (NPRA) genes and the presence and extent of CAD in 158 patients (CAD group) with a history of myocardial infarction (MI), as well as the relation of the studied polymorphisms with high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) concentrations.

**Methods and results.** 144 age-matched controls formed the control group. All participants were of Hellenic origin. All patients underwent coronary angiography and 3 subgroups were identified according to the number of vessels with >50% luminal obstruction: non-obstructive lesions or 1-vessel, 2-vessel and 3-vessel disease subgroups (n=47, 51 and 60 respectively). The AGT, REN and NPRA alleles were classified as short (S) or long (L) using the median as the cut-off point. SS genotype of the AGT gene was related with an increased risk for 3-vessel CAD both between patients [odds ratio (OR): 1.945, 95% Confidence Interval (CI): 1.006-3.762] and when compared with controls (OR: 1.944, 1.047-3.609). On the contrary, SL genotype of the AGT was associated with a decreased risk (OR: 0.449, 0.218-0.923 and 0.441, 0.223-0.874 respectively). SL genotype of the REN gene was associated with an increased risk for the presence of CAD (OR: 2.183, 1.352-3.526), whereas

SS and LL with a protective effect (OR: 0.554, 0.345-0.888 and OR: 0.234, 0.055-0.996 respectively). However, after adjustment for confounding factors, all associations deriving from between group comparisons were not retained. hsCRP concentrations were equally distributed between study groups.

**Conclusions.** A significant association was identified, for the first time to our knowledge, between (CA)<sub>n</sub> polymorphism of the AGT gene and the extent of CAD in patients of Hellenic origin with a history of MI. Moreover, (TCTG)<sub>n</sub> polymorphism of the REN gene may be associated with the presence of CAD.

*Key words:* acute coronary syndromes, renin-angiotensin-aldosterone system, natriuretic peptide system, C-reactive protein, genetic polymorphisms.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	iv
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	ix
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</b> .....	xiii
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b> .....	xv
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ</b> .....	xvi
 <b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
 I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	 2
 II. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΩΝ ΕΠΕΙΣΟΔΙΩΝ .....	 3
 III. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΩΝ ΕΠΕΙΣΟΔΙΩΝ .....	 3
Η αθηρωματική πλάκα .....	3
Μηχανισμοί θρόμβωσης .....	5
Η υπόθεση της ευάλωτης αθηρωματικής πλάκας .....	8
Η ακολουθία των θρομβωτικών συμβαμάτων .....	9
Συμπτωματολογία σχετιζόμενη με την αθηροθρόμβωση .....	9
Κλινικές προεκτάσεις της στεφανιαίας αθηροθρόμβωσης.....	10
Φλεγμονή και στεφανιαία αθηρωμάτωση .....	11

IV. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΕΝΙΝΗΣ-ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ-ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗΣ (ΣΡΑΑ) .....	12
Γενικά χαρακτηριστικά .....	12
Αγγειοτενσίνη II .....	17
Υποδοχείς αγγειοτενσίνης .....	19
Υποδοχείς ρενίνης/προρενίνης .....	19
ΣΡΑΑ και αθηρωμάτωση .....	20
Θεραπευτικές προεκτάσεις της αναστολής του ΣΡΑΑ .....	23
V. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΝΑΤΡΙΟΥΡΗΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ (ΣΝΠ) .....	26
Γενικά χαρακτηριστικά πεπτιδίων και υποδοχέων του ΣΝΠ .....	26
Ο φυσιολογικός ρόλος των πεπτιδίων του ΣΝΠ .....	29
Ο κλινικός ρόλος των πεπτιδίων του ΣΝΠ .....	29
Η ρύθμιση των υποδοχέων του ΣΝΠ .....	31
VI. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ – Η C-ΑΝΤΙΔΡΩΣΑ ΠΡΩΤΕΙΝΗ (CRP) .....	33
Η δομή της CRP .....	34
Οι θέσεις σύνδεσης της CRP .....	35
Λειτουργίες της ανθρώπινης CRP .....	36
Η σύνθεση της CRP .....	37
CRP και στεφανιαία νόσος .....	37
Οι συγκεντρώσεις της CRP στο γενικό πληθυσμό .....	41
VI. ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ .....	41

Ανίχνευση «ένοχων» γονιδίων .....	41
Το εγχείρημα του ανθρώπινου γονιδιώματος .....	43
Προβλήματα στην αναγνώριση του γενετικού υπόβαθρου της ΣΝ .....	43
Οι μέχρι σήμερα γνωστές συσχετίσεις της ΣΝ με γενετικούς παράγοντες .....	45

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	57
II. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	58
Ο πληθυσμός της μελέτης .....	58
Κλινικοεργαστηριακός έλεγχος .....	60
Μέτρηση υψηλούς ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης .....	60
Στεφανιαία αγγειογραφία .....	61
Γενετική ανάλυση .....	63
Στατιστική ανάλυση .....	73
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	74
Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα .....	74
Συχνότητες γονοτύπων των πολυμορφισμών AGT (CA) <sub>n</sub> , ACE I/D, REN (TCTG) <sub>n</sub> και NPRA (CT) <sub>n</sub> .....	77
Επίδραση των πολυμορφισμών AGT (CA) <sub>n</sub> , ACE I/D, REN (TCTG) <sub>n</sub> και NPRA (CT) <sub>n</sub> στην εμφάνιση ΣΝ .....	80

Επίδραση των πολυμορφισμών AGT (CA) <sub>n</sub> , ACE I/D, REN (TCTG) <sub>n</sub> και NPRA (CT) <sub>n</sub> στη βαρύτητα της ΣΝ .....	80
AGT (CA) <sub>n</sub> , ACE I/D, REN (TCTG) <sub>n</sub> και NPRA (CT) <sub>n</sub> πολυμορφισμοί και φλεγμονή .....	82
Ανάλυση παλινδρόμησης (logistic regression analysis) .....	84
<b>IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>87</b>
Αγγειοτενσινογόνο (AGT) .....	87
Μετατρεπτικό Ένζυμο της Αγγειοτενσίνης (ACE) .....	90
Ρενίνη (REN) .....	92
Υποδοχέας Α των νατριουρητικών πεπτιδίων (NPRA) .....	94
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) .....	96
Περιορισμοί της μελέτης .....	99
Μελλοντικές προοπτικές – η σημασία της παρούσας μελέτης .....	100
<b>V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>102</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>104</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.</b> Οι τύποι, τα μόρια σύνδεσης και οι επιδράσεις της ενεργοποίησης των υποδοχέων του ΣΡΑΑ στην κυτταρική επιφάνεια .....	15
<b>Πίνακας 2.</b> Σύγκριση τριών μεγάλων κλινικών μελετών που διερεύνησαν την επίδραση της αναστολής του ACE στη συχνότητα καρδιαγγειακών συμβαμάτων .....	25
<b>Πίνακας 3.</b> Φυσιολογικές επιδράσεις των νατριουρητικών πεπτιδίων .....	30
<b>Πίνακας 4.</b> Σημαντικές μελέτες συσχέτισης της ΣΝ με γενετικούς πολυμορφισμούς γονιδίων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία αυτής ...	47
<b>Πίνακας 5.</b> Μελέτες συνολικού γονιδιώματος σε οικογένειες και συσχέτιση με τη ΣΝ .....	51
<b>Πίνακας 6.</b> Κυριότερες μελέτες συνολικού γονιδιώματος και συσχέτιση με τη ΣΝ .....	53
<b>Πίνακας 7.</b> Τιμές αναφοράς του Ανοσολογικού Εργαστηρίου για τη μέτρηση της hsCRP (mg/dL) .....	61
<b>Πίνακας 8.</b> Γενικά χαρακτηριστικά, εκκινητές και διαλύματα εργασίας των υπό εξέταση πολυμορφισμών .....	68
<b>Πίνακας 9.</b> Διάλυμα PCR για τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου του ACE .....	69
<b>Πίνακας 10.</b> Οι θερμικές συνθήκες της PCR για την ενίσχυση του πολυμορφισμού του ACE .....	69
<b>Πίνακας 11.</b> Διάλυμα PCR για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων AGT, REN και NPRA .....	70
<b>Πίνακας 12.</b> Οι θερμικές συνθήκες της PCR για την ενίσχυση των πολυμορφισμών των γονιδίων AGT, REN και NPRA .....	71
<b>Πίνακας 13.</b> Δημογραφικές, κλινικές και εργαστηριακές παράμετροι των ομάδων ΣΝ και ελέγχου .....	75

<b>Πίνακας 14.</b> Σχετικές συχνότητες γονοτύπων των πολυμορφισμών AGT (CA) <sub>n</sub> , ACE I/D, REN (TCTG) <sub>n</sub> και NPRA (CT) <sub>n</sub> και του D αλληλίου του I/D πολυμορφισμού του ACE στις ομάδες ελέγχου και ΣΝ .....	77
<b>Πίνακας 15.</b> Σχετικός κίνδυνος (ΣΚ) με 95% διαστήμα εμπιστοσύνης (ΔΕ) για την παρουσία της ΣΝ ως προς τους πολυμορφισμούς AGT (CA) <sub>n</sub> , ACE I/D, REN (TCTG) <sub>n</sub> και NPRA (CT) <sub>n</sub> .....	79
<b>Πίνακας 16.</b> Συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών AGT (CA) <sub>n</sub> , ACE I/D, REN (TCTG) <sub>n</sub> και NPRA (CT) <sub>n</sub> και της έκτασης της ΣΝ. Σχετικές γονοτυπικές συχνότητες και σχετικός κίνδυνος για ζαγγειακή ΣΝ μεταξύ των ασθενών και σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ....	81
<b>Πίνακας 17.</b> Κατανομή των τιμών της υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP) μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων των υπό εξέταση πολυμορφισμών στην ομάδα της ΣΝ .....	83
<b>Πίνακας 18.</b> Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση για την παρουσία ΣΝ .....	86
<b>Πίνακας 19.</b> Επίπεδα συγκεντρώσεων της CRP ως προς πολυμορφισμούς του γονιδίου της .....	97
<b>Πίνακας 20.</b> Προβλεπτική αξία του γενετικού μοντέλου κινδύνου για την πρόγνωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων στη μελέτη ARIC.....	101

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.</b> Η διαδικασία της αθηρωμάτωσης-μεταβολές στο αγγειακό τοίχωμα ...	4
<b>Εικόνα 2.</b> Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας .....	6
<b>Εικόνα 3.</b> Απλοποιημένη απεικόνιση των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων, των ενζύμων και των υποδοχέων του ΣΡΑΑ .....	13
<b>Εικόνα 4.</b> Σχηματική απεικόνιση των σημαντικών επιδράσεων της αγγειοτεν- σίνης II στους μηχανισμούς που σχετίζονται με την αθηρωμάτωση ..	21
<b>Εικόνα 5.</b> Βασική δομή των ανθρώπινων νατριουρητικών πεπτιδίων .....	27
<b>Εικόνα 6.</b> Σχηματική απεικόνιση της δομής και των γνωστών λειτουργιών των νατριουρητικών υποδοχέων .....	28
<b>Εικόνα 7.</b> Μηχανισμός δράσης της CRP .....	35
<b>Εικόνα 8.</b> Στιγμιότυπα από τη στεφανιαία αγγειογραφία δυο συμμετεχόντων στη μελέτη .....	62
<b>Εικόνα 9.</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR για τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου του ACE .....	73
<b>Εικόνα 10.</b> Εντόπιση του γονιδίου του AGT στο χρωμόσωμα 1 και απεικόνιση των βασικών γενετικών του δομών .....	88
<b>Εικόνα 11.</b> Εντόπιση του γονιδίου του ACE στο χρωμόσωμα 17 και απεικόνιση των βασικών γενετικών του δομών .....	91
<b>Εικόνα 12.</b> Εντόπιση του γονιδίου της REN στο χρωμόσωμα 1 και απεικόνιση των βασικών γενετικών του δομών .....	93
<b>Εικόνα 13.</b> Εντόπιση του γονιδίου του NPRA στο χρωμόσωμα 1 και απεικόνιση των βασικών γενετικών του δομών .....	95

**ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ**

<b>Γράφημα 1.</b> Επιπολασμός μειζόνων παραγόντων κινδύνου για ΣΝ στις υπό εξέταση ομάδες πληθυσμού .....	76
<b>Γράφημα 2.</b> Συγκεντρώσεις λιπιδίων στον ορό (mg/dL) στις υπό εξέταση ομάδες πληθυσμού (* $p < 0.05$ ) .....	76
<b>Γράφημα 3.</b> Συχνότητα γονοτύπων του (TCTG)η πολυμορφισμού του γονιδίου της REN .....	78
<b>Γράφημα 4.</b> Συχνότητα γονοτύπων του (CA)η πολυμορφισμού του γονιδίου του AGT στην ομάδα 3αγγειακής ΣΝ και στην ομάδα ελέγχου .....	82
<b>Γράφημα 5.</b> Συγκεντρώσεις υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP) στις ομάδες $\leq 1$ , 2 και 3αγγειακής ΣΝ .....	84



## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## I. Εισαγωγή

Υπολογίζεται ότι 20 περίπου ασθένειες είναι υπεύθυνες για περισσότερο από το 80% των θανάτων παγκοσμίως. Η αθηρωμάτωση των στεφανιαίων αγγείων, που αποτελεί το υπόβαθρο της στεφανιαίας νόσου (ΣΝ) και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων ενέχεται για σχεδόν τους μισούς από αυτούς τους θανάτους.<sup>1</sup> Είναι χαρακτηριστικό ότι στο Δυτικό Κόσμο κάθε άνθρωπος έχει 47% πιθανότητα να υποστεί ένα καρδιακό σύμβαμα κατά τη διάρκεια της ζωής του.<sup>2</sup> Η όσο το δυνατό αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των κοινών χρόνιων νοσημάτων, όπως η ΣΝ, απαιτεί εκτός των άλλων την εξακρίβωση του γενετικού υπόβαθρου και την πρακτική εφαρμογή της γνώσης αυτής στη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία. Η θνητότητα από τις καρδιακές παθήσεις μειώθηκε κατά 50% τα τελευταία 30 χρόνια, ωστόσο πρόσφατα η θνητότητα σταθεροποιήθηκε και δεν υποχωρεί περαιτέρω.<sup>3</sup> Το γεγονός αυτό είναι κατά κάποιο τρόπο αναμενόμενο, καθότι οι κλασικοί παράγοντες κινδύνου κατέχουν και ένα γενετικό υπόβαθρο. Η εξακρίβωση των γονιδίων που ενέχονται στην ανάπτυξη ΣΝ και η είσοδος της ανίχνευσής τους στην κλινική πράξη θα μπορούσε να οδηγήσει σε περαιτέρω μείωση της επίπτωσης και της νοσηρότητας αυτής στον αιώνα που διανύουμε. Μέχρι πρόσφατα δεν ήταν δυνατή η αναγνώριση γονοτύπων που συνδέονταν με πολύπλοκες ασθένειες, όπως η ΣΝ. Η τεχνολογία όμως τελευταία έχει δώσει τη δυνατότητα ανίχνευσης του γενετικού χάρτη των γονιδίων που ενέχονται σε διάφορες ασθένειες. Το γεγονός αυτό διανοίγει νέους ορίζοντες διάγνωσης και πρωτοπαθούς πρόληψης ασθενειών. Είναι πλέον ζήτημα κοινωνικό, ηθικό και νομικό να επεκταθεί η χρήση των νέων τεχνικών στο γενικό πληθυσμό με καταγραφή της ατομικής γενετικής ταυτότητας και προσαρμογή των μέτρων πρόληψης των ασθενειών ή θεραπείας των συνυπαρχόντων παραγόντων στα εξατομικευμένα γενετικά χαρακτηριστικά.

Τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα αποτελούν διακριτές κλινικές εκδηλώσεις της ΣΝ, που χαρακτηρίζονται από αιφνίδια έναρξη, ταχεία εξέλιξη και ως κοινό χαρακτηριστικό έχουν την προκαλούμενη διαταραχή στην αιμάτωση του μυοκαρδίου μέσω μεταβολών στη στεφανιαία κυκλοφορία. Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (ΟΕΜ), που αποτελεί και αντικείμενο της παρούσας μελέτης, η ασταθής στηθάγχη και ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος έχουν ως κοινό παθοφυσιολογικό υπόβαθρο την παρουσία αθηρωματικών πλακών στα στεφανιαία αγγεία.

## II. Επιδημιολογία των οξέων στεφανιαίων επεισοδίων

Σύμφωνα με πρόσφατες ανακοινώσεις για την επιδημιολογία των καρδιαγγειακών παθήσεων από την Αμερικάνικη Καρδιολογική Εταιρία περίπου 1.5 εκατομμύρια ασθενείς στις ΗΠΑ νοσηλεύονται κάθε χρόνο με διάγνωση οξέος στεφανιαίου επεισοδίου.<sup>4</sup> Το 80% των περιπτώσεων αυτών περιλαμβάνει επεισόδια ασταθούς στηθάγχης ή εμφράγματος του μυοκαρδίου χωρίς ανάρσταση του ST διαστήματος, ενώ το 20% αφορούν το έμφραγμα με ανάρσταση του ST. Η ετήσια επίπτωση των οξέων στεφανιαίων επεισοδίων στον Ελλαδικό χώρο εκτιμάται σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης σε 22.6 περιστατικά ανά 10000 άτομα με αύξηση της επίπτωσης κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών.<sup>5</sup> Η εξέλιξη της τεχνολογίας και των μεθόδων αντιμετώπισης των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων έχει οδηγήσει σε σημαντική αύξηση των καρδιαγγειακών επεμβάσεων που στοχεύουν στη θεραπεία αυτών. Έτσι η ετήσια συχνότητα διαδερμικών αγγειοπλαστικών ξεπερνάει κατά πολύ το μισό εκατομμύριο στις ΗΠΑ και συνεχώς αυξάνεται, ενώ η συχνότητα των αορτοστεφανιαίων παρακάμψεων έχει παραμείνει σταθερή.<sup>4</sup>

## III. Παθοφυσιολογία των οξέων στεφανιαίων επεισοδίων

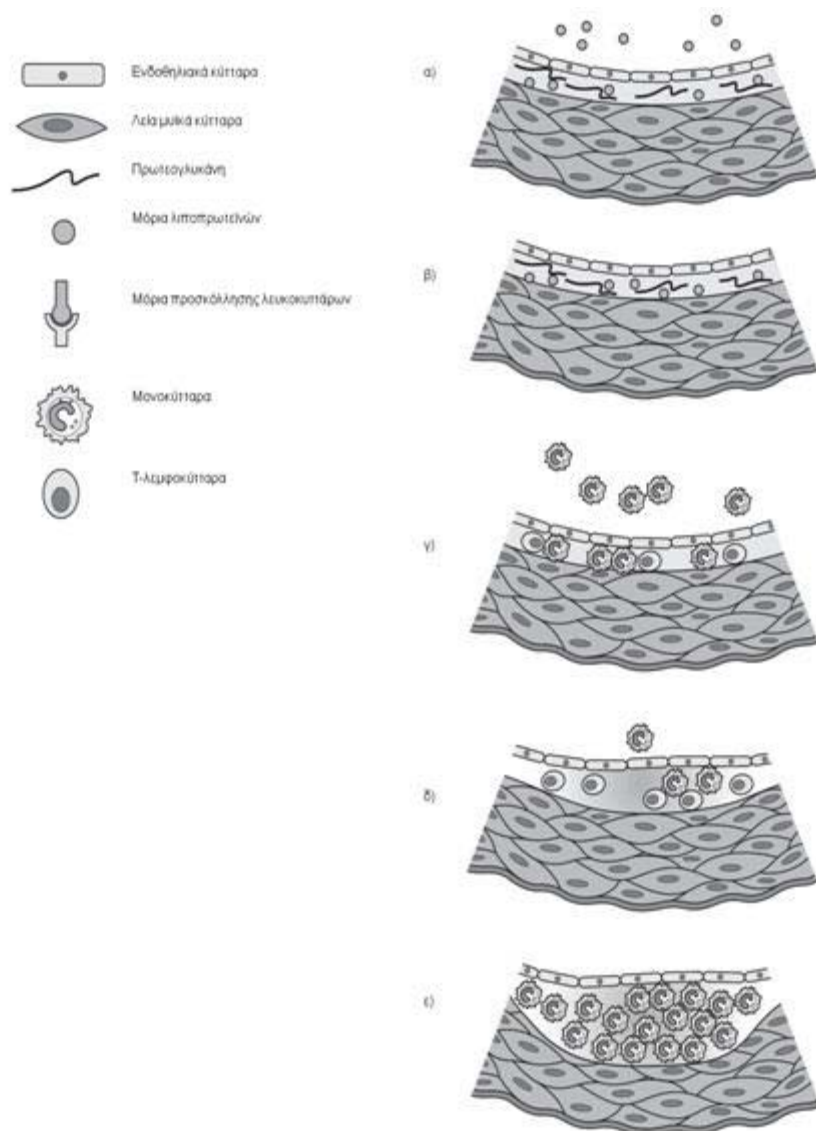
Σχεδόν το σύνολο των περιοχικών OEM προκαλούνται από θρόμβους που σχηματίζονται επάνω σε ασταθείς αθηρωματικές πλάκες. Οι εξαιρέσεις στον παραπάνω κανόνα είναι ο αιφνίδιος διαχωρισμός μιας στεφανιαίας αρτηρίας, η στεφανιαία αρτηρίτιδα, η εμβολή στα στεφανιαία, ο στεφανιαίος σπασμός και η συμπίεση από μυοκαρδιακή γέφυρα. Η θρόμβωση είναι επίσης ο πιο σημαντικός εναρκτήριο παράγοντας και για την ασταθή στηθάγχη, ιδίως σε περιπτώσεις που το θωρακικό άλγος είναι πρόσφατης έναρξης και επιδεινώνεται σταδιακά. Νεκροτομικά ευρήματα δείχνουν ότι στο 50-70% των αιφνιδίων θανάτων που οφείλονται σε ισχαιμική καρδιακή νόσο ανευρίσκονται νεοσχηματισμένοι θρόμβοι στα στεφανιαία αγγεία.

### ***Η αθηρωματική πλάκα***

Με βάση τη σημασία της θρόμβωσης ως παράγοντα γένεσης της οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας κρίνεται σημαντική η αναφορά της δομής των αθηρωματικών

πλακών και η ανάλυση των αιτιών μεταβολής των πλακών από τη σταθερή κατάσταση (χρόνια ΣΝ) στην ασταθή (κίνδυνος οξέος στεφανιαίου επεισοδίου).

### Εικόνα 1. Η διαδικασία της αθηρωμάτωσης-μεταβολές στο αγγειακό τοίχωμα



α) συσσώρευση λιποπρωτεϊνικών μορίων, β) οξείδωση λιποπρωτεϊνών, γ) προσκόλληση και είσοδος λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα, δ) δημιουργία αφρωδών κυττάρων και σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας, ε) τελικός σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας με ινώδη κάψα και λιπώδη πυρήνα.

Η πλήρως ανεπτυγμένη αθηρωματική ινολιπώδης πλάκα, που χαρακτηρίζεται με βάση την Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρία (AHA) ως τύπου IV ή τύπου Va, αποτελείται από έναν λιπώδη πυρήνα, ο οποίος περιβάλλεται από ένα περίβλημα συνδετικού ιστού.<sup>6</sup> Ο πυρήνας της πλάκας είναι μια εξωκυττάρια μάζα λιπώδους ιστού που περιέχει χοληστερόλη και τους εστέρες αυτής, ορισμένους από τους οποίους σε κρυσταλλοειδή μορφή. Ο πυρήνας περιβάλλεται από διάφορα μακροφάγα, πολλά εκ των οποίων περιέχουν περίσσεια κυτταροπλασματικών αποθεμάτων χοληστερόλης (αφρώδη κύτταρα) (**εικόνα 1**). Τα μακροφάγα αυτά προέρχονται από μονοκύτταρα τα οποία έχουν διέλθει μέσω του ενδοθηλίου από τον αγγειακό αυλό. Στο ενδοαγγειακό χώρο τα μακροφάγα δεν είναι αδρανή, αλλά αποτελούν εξαιρετικά ενεργοποιημένα κύτταρα που παράγουν προθρομβωτικό ιστικό παράγοντα, καθώς και ένα σύνολο μορίων-μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), οι ιντερλευκίνες και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες. Ο περιβάλλων τον πυρήνα συνδετικός ιστός αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο που έχει παραχθεί από λείες μυϊκές ίνες. Το τμήμα του εξωτερικού περιβλήματος της πλάκας που έρχεται σε επαφή με τον αγγειακό αυλό ονομάζεται κάψα της πλάκας.

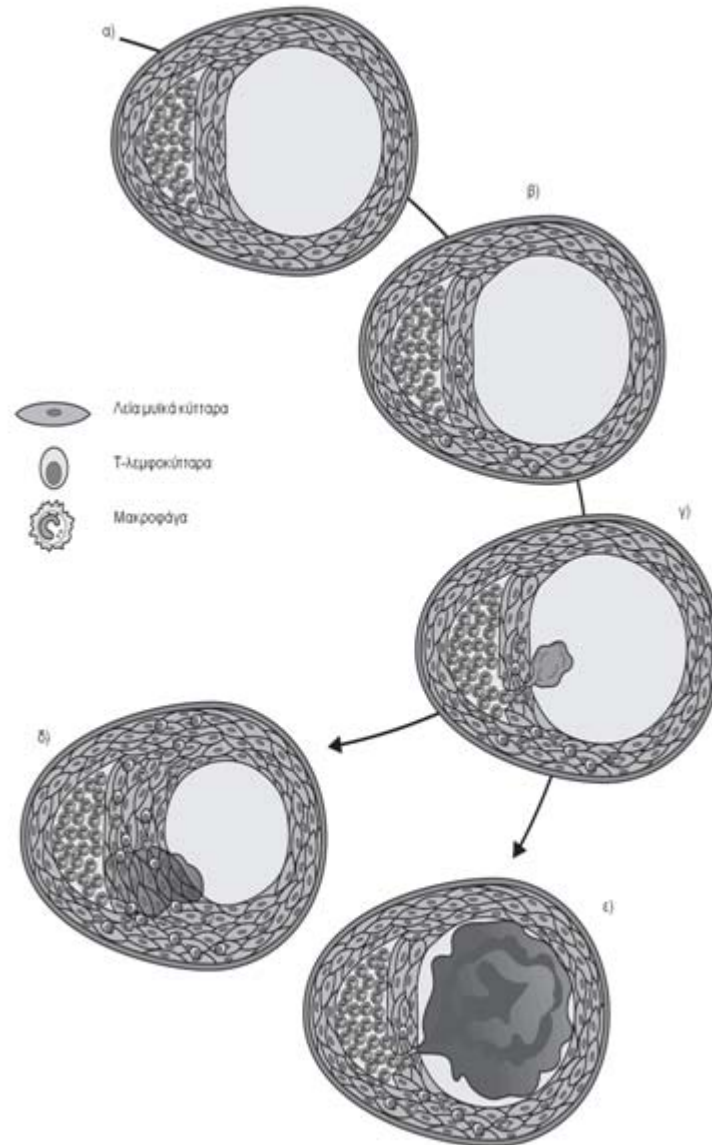
Τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης της πλάκας (τύποι I-III κατά AHA) δε σχετίζονται με ενδείξεις δομικών βλαβών του ενδοθηλίου. Ωστόσο, στο στάδιο IV οι δομικές αυτές βλάβες είναι σχεδόν πάντα παρούσες.<sup>7</sup> Το ενδοθήλιο πάνω και ανάμεσα στις αθηρωματικές πλάκες εμφανίζει αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με φυσιολογικές αρτηρίες, γεγονός που είναι ενδεικτικό της ανωριμότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων και της διαταραγμένης φυσιολογικής λειτουργίας αυτών. Πάνω στην πλάκα εμφανίζονται τοπικά περιοχές ενδοθηλιακής διάβρωσης, οι οποίες επιτρέπουν την επαφή της θεμέλιας ουσίας του υποκείμενου συνδετικού ιστού με τον αγγειακό αυλό. Αυτό επιτρέπει το σχηματισμό μιας μονοστιβάδας αιμοπεταλίων που κατευθύνονται στις περιοχές αποκάλυψης της αθηρωματικής κάψας. Οι μικροσκοπικοί θρόμβοι που σχηματίζονται είναι μη ορατοί στην αγγειογραφία και δεν προκαλούν διαταραχές στην αιματική ροή, αλλά μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη των λείων μυϊκών κυττάρων της πλάκας μέσω της απελευθέρωσης του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων.

### **Μηχανισμοί θρόμβωσης**

Η θρόμβωση δημιουργείται στην επιφάνεια αθηρωματικών βλαβών μέσω δύο βασικών μηχανισμών. Ο ένας οφείλεται στην επέκταση της διαδικασίας της

ενδοθηλιακής διάβρωσης, οπότε μεγάλες περιοχές του υποκείμενου συνδετικού ιστού εκτίθενται στην αιματική κυκλοφορία και προκαλούν τη δημιουργία θρόμβου.

### Εικόνα 2: Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας



α) αρτηριακή αναδιαμόρφωση κατά τη διάρκεια της αθηρογένεσης. Η αρτηρία αυξάνει σε διάμετρο, αλλά ο αυλός παραμένει φυσιολογικός, β) φλεγμονώδης αντίδραση σε μια ασταθή πλάκα-διήθηση από μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα, γ) ρήξη αθηρωματικής πλάκας και έναρξη μηχανισμών αρτηριακής θρόμβωσης, δ) επούλωση ενδοτοιχωματικού θρόμβου με συνοδό ίνωση και ελάττωση της διαμέτρου του αυλού, ε) αποφρακτικός θρόμβος και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Διάφορες μελέτες παρατήρησης έδειξαν ότι οι περιοχές απώλειας των ενδοθηλιακών κυττάρων βρίσκονται κοντά στα σημεία εντόπισης των μακροφάγων. Τα μακροφάγα αυτά είναι ενεργοποιημένα και προκαλούν ενδοθηλιακό κυτταρικό θάνατο λόγω απόπτωσης και λόγω παραγωγής πρωτεασών, ουσιών που αποσπούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τις θέσεις σύνδεσης με το αγγειακό τοίχωμα.

Ο δεύτερος μηχανισμός δημιουργίας των θρόμβων είναι η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Κατά αυτόν η κάψα της πλάκας ρηγνύεται και ο λιπώδης πυρήνας της εκτίθεται στην αιματική κυκλοφορία. Η σύσταση του πυρήνα τον καθιστά εξαιρετικά θρομβογόνο, καθώς περιέχει ιστικό παράγοντα, κατάλοιπα του κολλαγόνου και κρυσταλλοειδείς επιφάνειες που επιταχύνουν την πήξη του αίματος. Έτσι, ο θρόμβος αρχικά σχηματίζεται μέσα στην πλάκα, η οποία έχει διαρραγεί και εκτεθεί από το εσωτερικό της. Στη συνέχεια ο θρόμβος μπορεί να επεκταθεί και στον αγγειακό αυλό (**εικόνα 2**).

Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, όπως και η ενδοθηλιακή διάβρωση, είναι αποτέλεσμα της αυξημένης φλεγμονώδους δραστηριότητας στο αγγειακό τοίχωμα.<sup>8</sup> Η κάψα της πλάκας αποτελεί μια δυναμική δομική οντότητα, κατά την οποία η θεμέλια ουσία του συνδετικού ιστού συνεχώς αντικαθίσταται από τις λείες μυϊκές ίνες. Η διατήρηση της ποιότητας της θεμέλιας ουσίας είναι απαραίτητη για την ισχύ της αντίστασης του αγγειακού τοιχώματος σε αυξημένη ενδαγγειακή τάση. Η φλεγμονή μειώνει την κολλαγονική σύνθεση αναστέλλοντας τις λείες μυϊκές ίνες και προκαλεί κυτταρικό θάνατο από απόπτωση. Τα μακροφάγα, επίσης, παράγουν ένα μεγάλο φάσμα μεταλλοπρωτεϊνών ικανών να μεταβολίσουν όλα τα συστατικά της θεμέλιας ουσίας του συνδετικού ιστού, συμπεριλαμβανομένου και του κολλαγόνου. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες εκκρίνονται μέσα στους ιστούς σε αδρανή μορφή και ενεργοποιούνται εκεί από την πλασμίνη. Η παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών από τα μακροφάγα αυξάνεται με την παρουσία φλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο TNFα. Έτσι η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα αυτοκαταστροφικό φαινόμενο σχετιζόμενο με το μηχανισμό της φλεγμονής. Σε αυτό το επίπεδο παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα ανοσολογικών δεικτών της φλεγμονής όπως είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP).

Η παρουσία διάβρωσης ή ρήξης ως αιτία οξέων στεφανιαίων επεισοδίων μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών. Η ρήξη αποτελεί τη πιο συχνή αιτία (>85%) των μεγάλων στεφανιαίων θρόμβων σε λευκούς άνδρες με υψηλά επίπεδα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) και μειωμένα επίπεδα υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL). Αντίθετα, στις γυναίκες η ενδοθηλιακή

διάβρωση είναι υπεύθυνη για το 50% περίπου των περιπτώσεων δημιουργίας μεγάλων θρόμβων.<sup>9-11</sup> Η διάκριση μεταξύ ρήξης και διάβρωσης δεν έχει σημαντική κλινική επίπτωση. Και οι δύο μηχανισμοί εξαρτώνται από την αυξημένη φλεγμονώδη δραστηριότητα και απαντούν παρόμοια στη χορήγηση υπολιπιδαιμικών φαρμάκων. Στο μηχανισμό της ρήξης η παρουσία ενός τμήματος του θρόμβου εντός της αθηρωματικής κάψας καθιστά δυσχερέστερη την ινωδολυτική θεραπεία, ενώ στο μηχανισμό της διάβρωσης ο θρόμβος είναι άμεσα προσβάσιμος στη θεραπεία.

### ***Η υπόθεση της ευάλωτης αθηρωματικής πλάκας***

Η ανάλυση πλακών που υπέστησαν ρήξη επέτρεψε την αναγνώριση των ιδιαίτερων αυτών χαρακτηριστικών που καθιστούν σταθερές πλάκες υποψήφιες για μελλοντική ρήξη (ευάλωτες πλάκες). Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι:<sup>12</sup>

- α) Ο μεγάλος λιπώδης πυρήνας που καταλαμβάνει τουλάχιστον το 50% του συνολικού όγκου της πλάκας
- β) Η υψηλή περιεκτικότητα σε μακροφάγα
- γ) Η χαμηλή πυκνότητα της κάψας σε ότι αφορά τις λείες μυϊκές ίνες
- δ) Η υψηλή περιεκτικότητα σε ιστικό παράγοντα
- ε) Η παρουσία λεπτής κάψας με αποδιοργανωμένο δίκτυο κολλαγόνου
- στ) Πιθανόν η αυξημένη θερμοκρασία της αθηρωματικής πλάκας
- ζ) Η αυξημένη παρουσία αγγείων των αγγείων (vasa vasorum)

Πολλοί από τους παραπάνω δείκτες μελλοντικού κινδύνου είναι πιθανόν αποτέλεσμα της δραστηριότητας των μακροφάγων, τα οποία μεγεθύνουν τον πυρήνα και λεπταίνουν την κάψα. Ο κίνδυνος ενός ατόμου που πάσχει από ΣΝ να υποστεί ένα μελλοντικό οξύ στεφανιαίο επεισόδιο εξαρτάται περισσότερο από τον αριθμό των ευάλωτων αθηρωματικών πλακών που υπάρχουν στο στεφανιαίο αγγειακό δίκτυο, παρά από το συνολικό αριθμό των πλακών. Ωστόσο, μεταξύ των ασθενών ο αριθμός των ευάλωτων πλακών ποικίλει, γεγονός που εξηγεί τη διαφοροποίηση της συχνότητας των στεφανιαίων επεισοδίων μεταξύ των ασθενών. Ενώ σε κάποια άτομα μπορεί να εμφανίζονται κατ' επανάληψη θρόμβοι στο στεφανιαίο δίκτυο, η κλινική πορεία κάποιων άλλων διαδράμει μετά το αρχικό οξύ επεισόδιο χωρίς νεότερα συμβάματα.



### ***Η ακολουθία των θρομβωτικών συμβαμάτων***

Ο σχηματισμός θρόμβων ως αποτέλεσμα ρήξης ή διάβρωσης είναι μια δυναμική διαδικασία που εξελίσσεται σε διάφορες φάσεις. Στη ρήξη η αρχική φάση σχηματισμού πραγματοποιείται μέσα στην αθηρωματική κάψα και ο θρόμβος αποτελείται κυρίως από αιμοπετάλια. Καθώς αυτός επεκτείνεται προς τον αυλό η περιεκτικότητα σε ινική αυξάνει, αλλά η επιφάνεια που έρχεται σε επαφή με την αιματική κυκλοφορία είναι πάντα καλυμμένη από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Ο στροβιλισμός του αίματος που προκαλείται από τη σταδιακά μειούμενη διάμετρο του αγγειακού αυλού αποσπά μικρά θραύσματα αιμοπεταλίων τα οποία παρασυρόμενα από την κυκλοφορία αποφράσσουν ως μικροέμβολα ενδομυοκαρδιακές αρτηρίες. Ο αρχικός θρόμβος μπορεί να αυξηθεί και να καταλάβει το σύνολο της διαμέτρου του αγγείου (τελικό στάδιο θρόμβωσης). Στη φάση αυτή αποτελείται από ένα χαλαρό δίκτυο ινικής που περιέχει μεγάλο αριθμό παγιδευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στο τελικό στάδιο ο θρόμβος μπορεί να επεκταθεί προς την περιφέρεια του αγγείου μετά την έναρξη του οξέος στεφανιαίου επεισοδίου. Ο αποφράσων θρόμβος είναι γενικά ευαίσθητος στη φυσική και εξωγενή θρομβόλυση, αλλά ο αρχικά σχηματισμένος (ενδοτοιχωματικός-πρώτα στάδια θρόμβωσης) παρουσιάζει σημαντική αντίσταση σε αυτή.

### ***Συμπτωματολογία σχετιζόμενη με την αθηροθρόμβωση***

Τα επεισόδια ρήξης των αθηρωματικών πλακών σχετίζονται με την έναρξη ή την επιδείνωση της προϋπάρχουσας στηθάγχης μέσω αύξησης του όγκου της πλάκας. Οι θρόμβοι που επεκτείνονται στον αυλό χωρίς να τον αποφράσουν αποτελούν τη βάση της ασταθούς στηθάγχης. Τα παροδικά επεισόδια θωρακικού άλγους ηρεμίας μπορεί να οφείλονται στους παρακάτω μηχανισμούς:

- α) Αυξομείωση του μεγέθους του θρόμβου, ο οποίος για μικρά χρονικά διαστήματα μπορεί να καταστεί αποφρακτικός
- β) Αυξημένη τοπική αγγειοσύσπαση, η οποία μειώνει περαιτέρω τη διάμετρο του αυλού
- γ) Σύσπαση των λείων μυϊκών ινών ως αποτέλεσμα της δράσης των εναποτιθέμενων αιμοπεταλίων

δ) Εμβολή συσσωμάτων αιμοπεταλίων στις ενδομυοκαρδιακές αρτηρίες (μεγέθους 50-100 $\mu$ m) και προκαλούμενη τοπική αγγειοσύσπαση. Νεκροτομικά ευρήματα επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση τέτοιων αιμοπεταλιακών θρόμβων με μικροσκοπικές εστίες μυοκαρδιακής νέκρωσης.<sup>13, 14</sup>

### **Κλινικές προεκτάσεις της στεφανιαίας αθηροθρόμβωσης**

Πριν από περίπου 30 χρόνια η θρόμβωση των στεφανιαίων αγγείων θεωρούνταν το αποτέλεσμα παρά η πρωτογενής αιτία του OEM. Με τη χρήση της αγγειογραφίας διαπιστώθηκε ότι η προκαλούσα το OEM αρτηρία ήταν αποφραγμένη και ότι με την πάροδο του χρόνου επιτελούνταν η επαναγγείωση (ενδογενής ή υποβοηθούμενη από την ινωδολυτική θεραπεία). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην αναγνώριση των θρόμβων ως δυναμικών δομών του στεφανιαίου δικτύου. Τα αποτελέσματα των στεφανιαίων αγγειογραφιών μετέβαλλαν και σε άλλο επίπεδο τις κλασικές αντιλήψεις για το OEM. Διαπιστώθηκε ότι σημαντικό ποσοστό των αποφρακτικών θρόμβων δεν αναπτυσσόταν σε περιοχές όπου προϋπήρχε σημαντικού βαθμού στένωση του αυλού του αγγείου, ενώ σε πολλές περιπτώσεις δεν ανιχνευόταν ούτε η ύπαρξη μιας προϋπάρχουσας αθηρωματικής πλάκας. 68% των αποφράξεων που οδηγούν σε OEM συμβαίνουν σε πλάκες που προκαλούν <50% στένωση του αυλού, ενώ μόλις το 14% αναπτύσσεται πάνω σε προϋπάρχουσες σημαντικές στενώσεις (>70%).<sup>15</sup>

Το παραπάνω φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί και στο γεγονός ότι πολλές σταθερές αθηρωματικές πλάκες είναι αγγειογραφικά μη ανιχνεύσιμες, λόγω μιας διαδικασίας που ονομάζεται αγγειακή αναδιαμόρφωση. Κατά τη διαδικασία αυτή η αρτηρία αντιδρά στην ανάπτυξη της πλάκας με την αύξηση της εξωτερικής της διαμέτρου με σκοπό τη διατήρηση των φυσιολογικών διαστάσεων του αγγειακού αυλού.<sup>16</sup> Η αγγειογραφία δεν μπορεί να προβλέψει τις περιοχές μελλοντικού κινδύνου για εμφάνιση OEM. Παρόλο που οι υψηλού βαθμού στενωτικές πλάκες μπορεί να εξελιχθούν σε αποφρακτικές, η διαδικασία αυτή είναι αργή, πολλές φορές επιπλέκεται από θρόμβωση εξαιτίας διάβρωσης, αλλά συχνά δεν οδηγεί σε OEM λόγω της παρουσίας παράπλευρης κυκλοφορίας. Έτσι, το 24% των πλακών που προκαλούν στένωση >80% εξελίσσονται σε χρόνια ολική απόφραξη σε χρονικό διάστημα 5 ετών.

Η μορφολογία της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας ποικίλει σημαντικά. Ακραίο παράδειγμα αποτελεί η παρουσία μιας μικρής σχισμής, η οποία δεν έρχεται σε συνάρτηση με την εκτεταμένη θρομβωτική απάντηση που προκαλεί. Η λύση

τέτοιων θρόμβων επαναφέρει τον αυλό του αγγείου σχεδόν στην πρότερα κατάστασή του, όπου αγγειογραφικά μπορεί να θεωρηθεί ως φυσιολογικός. Στο αντίθετο άκρο μια αθηρωματική πλάκα μπορεί να υποστεί πλήρη αποδιοργάνωση και να προκαλέσει απόφραξη του αυλού με ένα μίγμα θρόμβου και συστατικών της πλάκας. Τέλος ένα ακόμα είδος απόφραξης είναι η εκ των έσω επέκταση της πλάκας από το νεοσχηματισθέντα θρόμβο. Αυτού του είδους οι αποφράξεις θεωρητικά απαντούν καλύτερα στην πρωτογενή αγγειοπλαστική. Η εξακρίβωση της ακριβούς μορφολογίας της αθηρωματικής πλάκας δεν είναι δυνατόν να γίνει σε κλινικό επίπεδο.

Το διατοιχωματικό περιοχικό OEM είναι αποτέλεσμα της απόφραξης μιας στεφανιαίας αρτηρίας που επισυμβαίνει σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα λίγων ωρών και επιμένει για 6-8 περίπου ώρες. Ο εμφραγματικός ιστός παρουσιάζεται ομοιογενής (το σύνολο του μυοκαρδίου νεκρώνεται την ίδια περίπου χρονική στιγμή. Τα μη διατοιχωματικά περιοχικά εμφράγματα περιέχουν περιοχές νεκρώσεων διαφορετικής χρονολογικά ηλικίας. Η κλινική εικόνα της ασταθούς στηθάγχης χαρακτηρίζεται από ποικίλη φαινοτυπική έκφραση και βαρύτητα.<sup>17</sup> Οι νεκροτομικές μελέτες δείχνουν ότι προκαλείται από τη ρήξη αθηρωματικών πλακών με συνοδό δημιουργία θρόμβου, αλλά διατήρηση της διαβατότητας του αγγείου. Η παρουσία ροής είναι το μοναδικό χαρακτηριστικό που διαχωρίζει την ασταθή στηθάγχη από το OEM. Η επιμονή του θρομβωτικού φαινομένου που ισορροπεί μεταξύ μη απόφραξης και μη ίασης αντικατοπτρίζει την ισορροπία μεταξύ θρομβωτικών και αντιθρομβωτικών παραγόντων. Η επιβεβαίωση της παρουσίας της ραγείσας πλάκας και του θρόμβου στην ασταθή στηθάγχη προέκυψε από τα αποτελέσματα αγγειογραφιών, όπου αναγνωρίστηκαν τύπου II βλάβες με ανώμαλα αλληλοεπικαλυπτόμενα άκρα και συνοδά ενδοαυλικά ελλείμματα πλήρωσης (θρόμβοι).<sup>18</sup> Τα παραπάνω ευρήματα είναι σπάνια στη σταθερή στηθάγχη.

### **Φλεγμονή και στεφανιαία αθηρωμάτωση**

Ο όγκος καθεμιάς από τις αθηρωματικές πλάκες των στεφανιαίων αγγείων είναι μικρός, αλλά πολλοί ασθενείς με ΣΝ έχουν παράλληλα και πλάκες στις καρωτίδες και την αορτή που μπορεί να φτάνουν τα 2cm σε μήκος. Εξαιτίας αυτού εξηγείται η αύξηση των συστηματικών δεικτών φλεγμονής (ινοδωγόνο και CRP) σε περιπτώσεις ασθενών με χρόνια σταθερή ΣΝ. Άλλωστε η αθηρωματική νόσος θεωρείται μια συστηματική νόσος, όπου πάσχει όλο το ανθρώπινο αγγειακό δίκτυο. Σε μια παλαιότερη μελέτη φάνηκε ότι η διαφορά μεταξύ του κατώτερου και του

ανώτερου τεταρτημορίου των συγκεντρώσεων CRP αντιστοιχούσε σε τριπλάσια αύξηση του κινδύνου για μελλοντικό οξύ καρδιαγγειακό επεισόδιο.<sup>19</sup> Οι αυξημένες συγκεντρώσεις της CRP δεν αντιπροσωπεύουν απαραίτητα και τη βαρύτητα του αθηρωματικού φορτίου. Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η συστηματική φλεγμονώδης απάντηση μπορεί να είναι δευτεροπαθής απάντηση στην πρωτοπαθώς αυξημένη φλεγμονώδη δραστηριότητα της αθηρωματικής πλάκας.<sup>20, 21</sup>

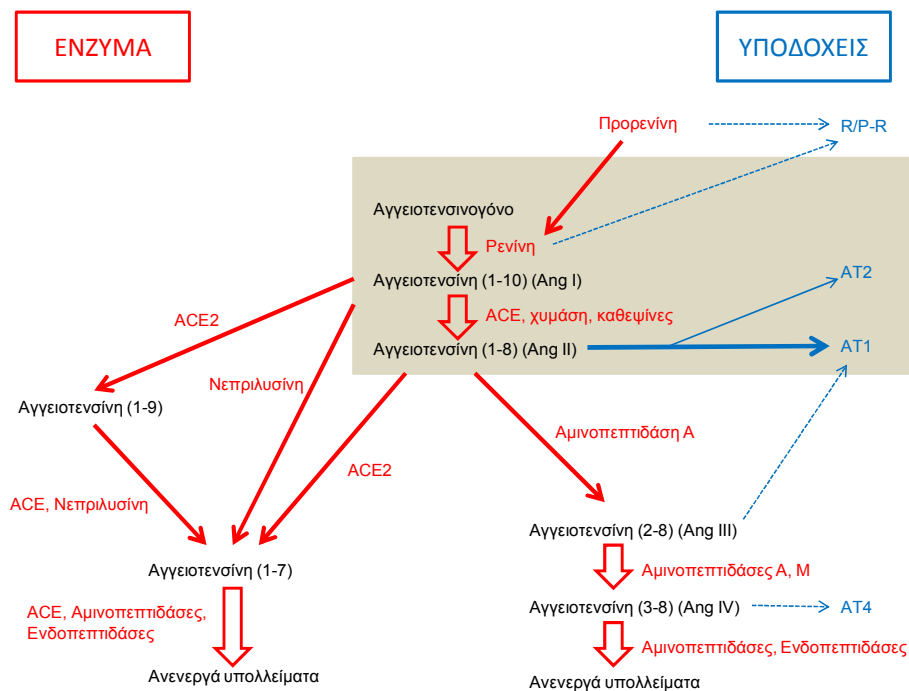
#### IV. Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (ΣΡΑΑ)

##### *Γενικά χαρακτηριστικά*

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (ΣΡΑΑ) βρίσκεται στο επίκεντρο της ιατρικής έρευνας για πολλές δεκαετίες. Ως αποτέλεσμα αυτού η γνώση για τις καρδιαγγειακές, νεφρικές και αθηροσκληρωτικές νόσους αυξήθηκε σημαντικά, ενώ η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών έχει γίνει περισσότερο επικεντρωμένη, λαμβάνοντας υπόψη και τους συνυπάρχοντες παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Παράλληλα, εκτός από το στόχο του ελέγχου της αρτηριακής πίεσης στην υπέρταση ή τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης πλάσματος στο σακχαρώδη διαβήτη, έχει καταστεί επιβεβλημένη η χορήγηση θεραπειάς που στοχεύει και στην οργανοπροστασία. Ο αποκλεισμός του ΣΡΑΑ αποτελεί μια στρατηγική, που με βάση επιβεβαιωμένα δεδομένα, δρα προστατευτικά στο καρδιαγγειακό σύστημα, στο κυκλοφορικό σύστημα του εγκεφάλου και στο νεφρικό σύστημα. Η ρενίνη περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από περισσότερο από 100 χρόνια από τους Tigerstedt και Bergman. Ωστόσο, η κατανόηση όλων των παραμέτρων και της δράσης όλων του συστατικών του ΣΡΑΑ δεν είναι ακόμα πλήρης, καθώς φαίνεται ότι είναι εξαιρετικά πολυπλοκότερο από ότι αρχικά είχε υποτεθεί (**εικόνα 3**).

Το ΣΡΑΑ αποτελεί ένα ορμονικό μηχανισμό παραγωγής αγγειοτενσίνης II, μιας ουσίας που έχει πολυάριθμες επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα. Η αγγειοτενσίνη II παράγεται σε δύο στάδια: στο πρώτο περιλαμβάνεται η επίδραση της ρενίνης (REN) στο αγγειοτενσινογόνο (AGT) που οδηγεί στην παραγωγή αγγειοτενσίνης I, ενώ στο δεύτερο το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) παράγει αγγειοτενσίνη II από την I.<sup>22</sup>

### Εικόνα 3: Απλοποιημένη απεικόνιση των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων, των ενζύμων και των υποδοχέων του ΣΡΑΑ



ACE: μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης, R/P-R: υποδοχέας ρενίνης/προρενίνης.

Σε ότι αφορά τη συστηματική δράση, το ΣΡΑΑ μέσω της αγγειοτενσίνης II συμβάλλει στη διατήρηση της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών, του ενδαγγειακού όγκου, της αρτηριακής πίεσης μέσω της προκαλούμενης αγγειοσύσπασης, της επαναρόφησης του νατρίου στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια και της προκαλούμενης παραγωγής αλδοστερόνης.

Η παραγωγή των αγγειοτενσινών I και II δε περιορίζεται στη συστηματική κυκλοφορία, καθώς έχει επιβεβαιωθεί και σε άλλες αγγειακές ή ιστικές περιοχές.<sup>23</sup> Συγκεκριμένα, έχει εντοπιστεί σε διάφορους ιστούς, όπως στον εγκέφαλο, στη καρδιά, στα αιμοφόρα αγγεία, στους νεφρούς, στο πάγκρεας, στον αναπαραγωγικό, λεμφοποιητικό και λιπώδη ιστό.<sup>24-27</sup> Το τοπικό σύστημα ΣΡΑΑ χαρακτηρίζεται από την παρουσία παραγόντων του ΣΡΑΑ: του AGT, των μετατρεπτικών ενζύμων, των αγγειοτενσινών και των ειδικών υποδοχέων.<sup>28</sup> Οι δράσεις του τοπικού ΣΡΑΑ συνοψίζονται στην κυτταρική ανάπτυξη και αναδιαμόρφωση στην καρδιά και τα

αγγεία, στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης και της νεφρικής λειτουργίας, στην κεντρική ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και ύδατος και στην έκκριση ορμονών. Δεν είναι ακόμα ξεκαθαρισμένο σε πιο βαθμό η συμβολή της τοπικής παραγωγής παραγόντων του ΣΡΑΑ<sup>29</sup> και ο ρυθμός επανακατανομής στην κυκλοφορία επηρεάζουν τις ιστικές συγκεντρώσεις των αγγειοτενσινών.<sup>30</sup>

Εκτός του ACE έχουν βρεθεί και άλλα ένζυμα ικανά να μετατρέψουν την αγγειοτενσίνη I σε II. Οι Uvata και συν. απομόνωσαν την καρδιακή χυμάση ως σημαντικότερο ένζυμο παραγωγής αγγειοτενσίνης II στον καρδιακό μυ.<sup>31</sup> Η δραστηριότητα της χυμάσης είναι παρούσα στο μυοκάρδιο και τον ιστό των αγγείων σε διάφορα ζωικά είδη, συμπεριλαμβανομένων και των τρωκτικών, αλλά η ικανότητα του ενζύμου να παράγει αγγειοτενσίνη II σε υγιείς ιστούς είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμη υπό φυσιολογικές συνθήκες.<sup>32</sup> Ωστόσο, ο ρόλος της χυμάσης μπορεί να καταστεί σημαντικός σε νοσούντες ή τραυματισμένους αγγειακούς ιστούς. Επιπλέον, η έκφραση του ενζύμου αυξάνεται στον αγγειακό ιστό των στεφανιαίων αγγείων και στο νεφρικό ιστό σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη.<sup>33</sup>

Το 2000, ανιχνεύτηκε ένα ακόμα ένζυμο που σχετίζεται με την παραγωγή πεπτιδίων της αγγειοτενσίνης, το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2), μια καρβοξυπεπτιδάση που έχει παρόμοια αλληλουχία με το ACE.<sup>34</sup> Το ACE2 δεν προκαλεί παραγωγή αγγειοτενσίνης, αλλά αύξησης της σύνθεσης της αγγειοτενσίνης (1-7). Αυτό το επταπεπτιδίο προκαλεί αγγειοδιαστολή και έχει ανασταλτικές αυξητικές ιδιότητες.<sup>35</sup> Η δράση της αγγειοτενσίνης (1-7) δε μεσολαβεί από τους υποδοχείς της αγγειοτενσίνης AT1 και AT2, αλλά πιθανόν από το mas ογκογονίδιο (**Πίνακας 1**). Η χρήση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (AMEA) ή αναστολέων των AT υποδοχέων αυξάνει τις συγκεντρώσεις της αγγειοτενσίνης (1-7),<sup>36</sup> γεγονός που εκδηλώνεται με αύξηση των συγκεντρώσεων της αγγειοτενσίνης I, ενώ οι αγγειοδιασταλτικές δράσεις του επταπεπτιδίου προκαλούν μείωση της αρτηριακής πίεσης.<sup>35</sup> Φαίνεται ωστόσο ότι το ACE2 έχει και άλλες επιπρόσθετες δράσεις, οι οποίες δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως.<sup>37-39</sup> Σε ότι αφορά ασθενείς με καρδιαγγειακές παθήσεις, έχει βρεθεί ότι το ACE2 υπερεκφράζεται στις περιπτώσεις καρδιακής ανεπάρκειας,<sup>40</sup> ενώ ένας απλότυπος του γονιδίου του σχετίζεται με την υπερτροφία της αριστερής κοιλίας.<sup>41</sup> Απαιτούνται περισσότερες μελέτες και πιθανόν η ανάπτυξη ειδικών αναστολέων του ACE2, ώστε να γίνουν κατανοητές οι δράσεις του εντός και εκτός του πλαισίου του ΣΡΑΑ.

**Πίνακας 1: Οι τύποι, τα μόρια σύνδεσης και οι επιδράσεις της ενεργοποίησης των υποδοχέων του ΣΡΑΑ στην κυτταρική επιφάνεια**

	ΟΝΟΜΑ	ΜΟΡΙΟ ΣΥΝΔΕΣΗΣ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
AT <sub>1</sub>	Υποδοχέας τύπου 1 της αγγειοτενσίνης II	Αγγειοτενσίνη II Αγγειοτενσίνη III	Αγγειοσυστολή, ενεργοποίηση της απελευθέρωσης αλδοστερόνης, ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, ευόδωση της κυτταρικής ανάπτυξης, εναπόθεση θεμέλιας ουσίας, φλεγμονή <sup>42</sup>
AT <sub>2</sub>	Υποδοχέας τύπου 2 της αγγειοτενσίνης II	Αγγειοτενσίνη II	Ανταγωνισμός των επιδράσεων του AT <sub>1</sub> , ευόδωση της απόπτωσης, <sup>42, 43</sup> προστασία νευρικού ιστού, <sup>37</sup> συνέργεια με τον AT <sub>1</sub> για την ευόδωση της φλεγμονής <sup>44, 45</sup>
AT <sub>4</sub>	Υποδοχέας της αγγειοτενσίνης IV	Αγγειοτενσίνη IV LVV-αιμορφίνη 7	Αγγειοδιαστολή, μειωμένη σωληναριακή μεταφορά νατρίου, βελτίωση της μνήμης, <sup>46</sup> πιθανή ευόδωση της φλεγμονής <sup>47</sup>
R/P-R	Υποδοχέας της ρενίνης/πρωρενίνης	Ρενίνη/πρωρενίνη	Αύξηση παραγωγής αγγειοτενσίνης, ανεξάρτητη επίδραση στην εναπόθεση θεμέλιας ουσίας <sup>48</sup>
Mas	Ογκογονίδιο mas	Αγγειοτενσίνη (1-7)	Ανταγωνισμός των επιδράσεων του AT <sub>1</sub> , <sup>49</sup> αντιδιούρηση, <sup>50</sup> αναστολή κυτταρικής ανάπτυξης. <sup>51</sup> (πιθανόν όλες οι δράσεις να μη μεσολαβούνται από το ογκογονίδιο mas

LVV: Leu-val-val (λευκίνη-βαλίνη-βαλίνη)

Οι επιδράσεις όλων των πεπτιδίων της αγγειοτενσίνης μεσολαβούνται από ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης. Ο AT<sub>1</sub> υποδοχέας μεσολαβεί τις επιδράσεις που κυρίως σχετίζονται με την αγγειοτενσίνη II. Ο AT<sub>2</sub> υποδοχέας ανταγωνίζεται πολλές από τις ιδιότητες του AT<sub>1</sub> (για παράδειγμα την πρόκληση συσσώρευσης των κυττάρων).<sup>52</sup> Ο ανταγωνισμός αυτός περιλαμβάνει και την άμεση σύνδεση της AT<sub>2</sub> πρωτεΐνης με τον AT<sub>1</sub> υποδοχέα.<sup>53</sup> Η διέγερση του AT<sub>2</sub>

υποδοχέα ασκεί προστατευτικές δράσεις σε διάφορα όργανα (π.χ. προφύλαξη του εγκεφάλου από ισχαιμία).<sup>54</sup> Ο AT4 υποδοχέας της αγγιοτενσίνης IV επηρεάζει τη λειτουργία των νεφρικών σωληναρίων και βελτιώνει τη μνήμη στα τρωκτικά.<sup>46</sup> Επιπλέον, το μόριο του ACE μπορεί από μόνο του να δράσει ως υποδοχέας κυτταρικής επιφάνειας, μεταφέροντας το ερέθισμα από την εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου στην εσωτερική σε ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*.<sup>55</sup> Ακόμα, η πιθανή ύπαρξη μιας εξαρτώμενης από υποδοχέα διαδικασίας επαναπρόσληψης της ρενίνης (και της προρενίνης ή και των δυο)<sup>48, 56</sup> οδήγησε στην απομόνωση του αντίστοιχου υποδοχέα το 2002 από τους Nguyen και συν.<sup>57</sup> Σε κύτταρα καλλιέργειας, ο υποδοχέας ρενίνης/προρενίνης συνδέεται και με τα δύο πεπτιδία, αυξάνοντας τη σύνθεση της αγγιοτενσίνης II και ενεργοποιώντας μηχανισμούς ίνωσης ανεξάρτητους από αυτήν.<sup>48, 57</sup> Από μελέτες σε ζώα ενισχύθηκε η άποψη ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα ρενίνης/προρενίνης αυξάνει την αρτηριακή πίεση.<sup>58</sup> Αντίθετα, ο ρόλος του υποδοχέα αυτού στον άνθρωπο δεν έχει ξεκαθαριστεί, αλλά σχετίζεται με το αποτέλεσμα της δράσης των αναστολέων της ρενίνης.

Η γνώση ότι το ΣΡΑΑ αποτελεί σημαντικότερο συντελεστή των καρδιαγγειακών παθήσεων ενισχύεται και από το γεγονός ότι η δραστηριότητα της ρενίνης έχει αναδειχθεί σε προβλεπτικό παράγοντα καρδιαγγειακών συμβαμάτων.<sup>59</sup> <sup>60</sup> Οι κλινικές μελέτες με αναστολείς παραγόντων του ΣΡΑΑ έχουν επίσης προσδώσει εξαιρετικά δεδομένα προς αυτή την κατεύθυνση. Αρχικά, πρέπει να αναφερθεί ότι η χρήση συμπαθητικολυτικών ουσιών (β-αποκλειστές) μειώνει τη σύνθεση αγγιοτενσίνης II μέσω αναστολής της έκκρισης ρενίνης από τους νεφρούς.<sup>61</sup> Η χρήση AMEA μειώνει τη μετατροπή αγγιοτενσίνης I σε II μέσω αναστολής του ACE και όχι του ACE2 ή άλλων ενζύμων παραγωγής αγγιοτενσίνης II. Τέλος υπάρχουν οι αναστολείς των AT υποδοχέων, οι οποίοι ανταγωνίζονται τη σύνδεση της αγγιοτενσίνης II στους AT1 υποδοχείς.

Οι AMEA και οι αναστολείς των AT υποδοχέων είναι οι σημαντικότεροι αναστολείς του ΣΡΑΑ που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. Η βιολογία του ΣΡΑΑ οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν κάποιες διαφορές στη δράση των δύο αυτών τύπων φαρμάκων. Για παράδειγμα, η χρήση AMEA δεν επηρεάζει την παραγωγή αγγιοτενσίνης II από παράπλευρες οδούς μη εξαρτώμενες από το ACE, ενώ οι αναστολείς των AT υποδοχέων ανταγωνίζονται όλες τις AT1 επιδράσεις. Αντίθετα, οι AMEA επηρεάζουν ισότιμα τους AT1 και AT2 υποδοχείς, ενώ οι αναστολείς των AT υποδοχέων αναστέλλουν μόνο τους AT1 και διεγείρουν τους AT2 υποδοχείς. Τα παραπάνω μπορεί να σχετίζονται με τη διαφορετική επίδραση στην πρόληψη των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων.<sup>54, 62</sup> Και οι δύο κατηγορίες



φαρμάκων δεν είναι αποκλειστικά αναστολείς του ΣΡΑΑ. Η συμβολή της βραδυκινίνης στην επίδραση των ΑΜΕΑ είναι ευρέως γνωστή,<sup>63</sup> αλλά λιγότερο γνωστό είναι το γεγονός ότι και οι αναστολείς των ΑΤ υποδοχέων αυξάνουν τα επίπεδα βραδυκινίνης στον άνθρωπο.<sup>64</sup> Επιπλέον, οι ΑΜΕΑ επηρεάζουν τον καταβολισμό και άλλων βιοενεργών πεπτιδίων.<sup>65</sup> Οι αναστολείς της ρενίνης βρίσκονται υπό κλινική αξιολόγηση, καθώς αποτελέσματα από κλινικές μελέτες φάσης ΙΙ έδειξαν ότι μπορούν να είναι αποτελεσματικοί στη μείωση της αρτηριακής πίεσης.<sup>66, 67</sup> Με βάση τη βιολογία του ΣΡΑΑ οι αναστολείς της ρενίνης κατέχουν την ενδιαφέρουσα προοπτική της ικανότητας αναστολής ολόκληρου του «καταρράκτη» του ΣΡΑΑ.

### **Αγγειοτενσίνη ΙΙ**

Η αγγειοτενσίνη ΙΙ αποτελεί το βασικό τελικό προϊόν του ΣΡΑΑ και ασκεί τις κύριες παθοφυσιολογικές επιδράσεις του συστήματος αυτού. Απομονώθηκε το 1940 και χαρακτηρίστηκε ως ένας αγγειοσυσπαστικός παράγοντας που αυξάνει τις περιφερικές αγγειακές αντιστάσεις και συνεπακόλουθα την αρτηριακή πίεση. Σε καταστάσεις μείωσης του όγκου του εξωκυττάριου υγρού, η αγγειοτενσίνη ΙΙ μειώνει την αποβολή νατρίου από τους νεφρούς, μέσω τροποποίησης της αιμοδυναμικής του νεφρού, μέσω άμεσης αύξησης της επαναρρόφησης νατρίου στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια και στα άπω τμήματα των άπω εσπειραμένων σωληναρίων και στα φλοιικά αθροιστικά σωληνάκια (μεσολάβηση της αλδοστερόνης).<sup>68-70</sup> Η αγγειοτενσίνη ΙΙ, επίσης, αυξάνει τη δίψα, την όρεξη για αλάτι και την εντερική απορρόφηση νατρίου, δράσεις που τελικά προκαλούν αύξηση του εξωκυττάριου όγκου.

Διάφορες πειραματικές μελέτες και κλινικές δοκιμές με τη χρήση ΑΜΕΑ και αναστολέων του υποδοχέα ΑΤ-1 έδειξαν ότι οι δράσεις του ΣΡΑΑ επεκτείνονται πολύ περισσότερο από τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας.<sup>71</sup> Είναι αποδεδειγμένο ότι οι δυσμενείς επιδράσεις του ΣΡΑΑ (μέσω της αγγειοτενσίνης ΙΙ) στην καρδιαγγειακή αναδιαμόρφωση και τη νεφρική λειτουργία είναι υπεύθυνες για την ευνοϊκή δράση των παραπάνω φαρμάκων σε ασθενείς με υπέρταση, υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, καρδιακή ανεπάρκεια και διαβητική νεφροπάθεια.<sup>71</sup> Ωστόσο, εκτός από το κυκλοφορούν ΣΡΑΑ, η αγγειοτενσίνη ΙΙ, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να παραχθεί τοπικά, δρώντας παρακρινικά, ενδοκρινικά ή και αυτοκρινικά.<sup>28</sup> Σε ότι αφορά τη συστηματική κυκλοφορία, η προερχόμενη από το νεφρό ρενίνη αποτελεί παράγοντα περιορισμού του ρυθμού περιφερικής παραγωγής αγγειοτενσίνης ΙΙ, ενώ σε τοπικό επίπεδο το ACE αλλά και άλλες πεπτιδάσες (πχ.

χυμάσες) ρυθμίζουν την παραγωγή της.<sup>28</sup> Παρόλο που σε τοπικό επίπεδο δεν πραγματοποιείται σύνθεση όλων των παραγόντων του ΣΡΑΑ, εναλλακτικές ενζυμικές οδοί ή η παρουσία του υποδοχέα της (προ)ρενίνης<sup>57</sup> οδηγούν σε σύνθεση αγγειοτενσίνης II. Επιπλέον, το ΣΡΑΑ έχει και ενδοκρινή δράση που οφείλεται στην ενδοκυττάρια παραγωγή της ουσίας.<sup>72, 73</sup> Μοριακές μελέτες έδειξαν ότι η ενδοκυττάρια αγγειοτενσίνη II προέρχεται ως επί το πλείστον από την είσοδο μέσω υποδοχέα μορίων της από τον εξωκυττάριο χώρο.<sup>74</sup>

Η αναστολή της δράσης της αγγειοτενσίνης II σε μη κλασικές περιοχές, όπως τα ανοσοκύτταρα, μπορεί να εξηγήσει τις μη αναμενόμενες ευνοϊκές επιδράσεις της θεραπείας με AMEA και AT1 αναστολείς.<sup>71</sup> Παράλληλα, μελέτες που αφορούσαν το μοριακό μηχανισμό δράσης της αγγειοτενσίνης II έδειξαν ότι ο κύριος στόχος της, ο AT1 υποδοχέας, αποτελεί έναν από τους πιο προσαρμοστικούς υποδοχείς, που εκπροσωπούν την οικογένεια των συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνη υποδοχέων. Επιπλέον, η αγγειοτενσίνη II επενεργεί με τρόπο ανάλογο των κυτοκινών, ενεργοποιώντας διάφορες οδούς, διεγείροντας τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα και ευνοώντας την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και άλλων προφλεγμονωδών μηχανισμών.

Διάφορες μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι οι βλαπτικές επιδράσεις της αγγειοτενσίνης II στο καρδιαγγειακό σύστημα μπορούν να αποδοθούν και στην αύξηση της αλδοστερόνης και άλλων κορτικοστεροειδών που ενεργοποιούν τον υποδοχέα των μεταλλοκορτικοειδών. Οι ορμόνες αυτές έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, καρδιακής και αγγειακής φλεγμονής και καρδιακών αρρυθμιών. Οι βλαπτικές επιδράσεις της αλδοστερόνης στο μυοκάρδιο αποκαλύφθηκαν σε μελέτες για την περιαγγειακή, διάμεση και κοιλιακή ίνωση, που σχετίζονται με την υπέρταση και την καρδιακή ανεπάρκεια.<sup>75</sup> Το εύρημα ότι η αγγειοτενσίνη II και η αλδοστερόνη ρυθμίζουν τη συσσώρευση του κολλαγόνου στο μυοκάρδιο ποντικών, οδήγησε στην υπόθεση ότι η κοιλιακή αναδιαμόρφωση στην καρδιακή ανεπάρκεια θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί με ανταγωνιστές των υποδοχέων της αλδοστερόνης.<sup>76</sup> Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από τις μελέτες RALES και EPHESUS, στις οποίες ο αποκλεισμός του υποδοχέα από τη σπιρονολακτόνη και την επλερονόνη αντίστοιχα, προκάλεσε στατιστικώς σημαντική μείωση της θνητότητας σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια.<sup>77, 78</sup> Η αλδοστερόνη έχει βρεθεί ότι ενισχύει την προκαλούμενη από την αγγειοτενσίνη II συσσώρευση λείων μυϊκών κυττάρων στα ποντίκια, μέσω αύξησης της έκφρασης του AT1 υποδοχέα.<sup>79, 80</sup> Πρόσφατες μελέτες σε λεία μυϊκά κύτταρα στεφανιαίων αγγείων στον άνθρωπο

έδειξαν ότι η αγγειοτενσίνη II και η αλδοστερόνη ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειακή ίνωση, τη φλεγμονή και την ασβέστωση.<sup>81</sup>

### **Υποδοχείς αγγειοτενσίνης**

Ο κυτταρικός υποδοχέας της αγγειοτενσίνης II (AT) απομονώθηκε το 1974 ως μια υψηλής συνάφειας μεμβρανική θέση ευαίσθητη στα γουανυλνουκλεοτίδια.<sup>82</sup> Στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν οι AT1 και AT2 υπότυποι με τη βοήθεια ειδικών συνδεσμικών μορίων<sup>42</sup> και χαρακτηρίστηκαν ως επτα-διαμεμβρανικοί υποδοχείς με μοριακές τεχνικές.<sup>83</sup> Έτσι, η αγγειοτενσίνη II δρα μέσω πολύπλοκων ενδοκυττάρων οδών που ενεργοποιούνται από τη σύνδεση του πεπτιδίου με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας AT1 και AT2.<sup>84</sup> Στους ανθρώπους ο AT1 υποδοχέας εκφράζεται κυρίως στα αιμοφόρα αγγεία, την καρδιά, τους νεφρούς, τα επινεφρίδια και το ήπαρ, ενώ ο AT2 εμφανίζεται κυρίως στον εμβρυικό ιστό και μειώνεται σταδιακά μετά τη γέννηση, ώστε να υπάρχει σε πολύ μικρές ποσότητες στους ιστούς ενός ενήλικου. Ο συνδεδεμένος με G-πρωτεΐνη AT1 υποδοχέας μεσολαβεί τις γνωστές φυσιολογικές και παθολογικές δράσεις της αγγειοτενσίνης II και υπόκειται σε απευαισθητοποίηση και εσωτερίκευση μετά από την ενεργοποίησή του. Αντίθετα, οι AT2 υποδοχείς δε κατέχουν παρόμοια χαρακτηριστικά και δρουν κυρίως μέσω του G<sub>i</sub> και φωσφατασών της τυροσίνης, αναστέλλοντας την κυτταρική απάντηση στην ενεργοποίηση των AT1 υποδοχέων και των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα.<sup>85</sup> Για παράδειγμα, οι δύο AT υποδοχείς παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των λείων μυϊκών κυττάρων, έχοντας αντίθετες δράσεις. Ενώ οι AT1 συνδέονται με την αύξηση, τη φλεγμονή και την αγγειοσύσπαση, οι AT2 σχετίζονται με την αναστολή της αυξητικής και φλεγμονώδους διαδικασίας και την πρόκληση απόπτωσης και αγγειοδιαστολής.<sup>84, 85</sup>

### **Υποδοχείς ρενίνης/προρενίνης**

Ο υποδοχέας της ρενίνης/προρενίνης φαίνεται να είναι σημαντικός παράγοντας του ιστικού ΣΡΑΑ, καθώς συγκεντρώνει ρενίνη στην κυτταρική επιφάνεια και τροποποιεί την ενεργοποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων με άμεσο ή έμμεσο έλεγχο της παραγωγής αγγειοτενσίνης II. Η σύνδεση στους υποδοχείς είναι ειδική για την προρενίνη και τη ρενίνη μόνο. Η συνδεδεμένη με τον υποδοχέα ρενίνη παρουσιάζει πενταπλάσια καταλυτική ικανότητα σε ότι αφορά τη μετατροπή του AGT

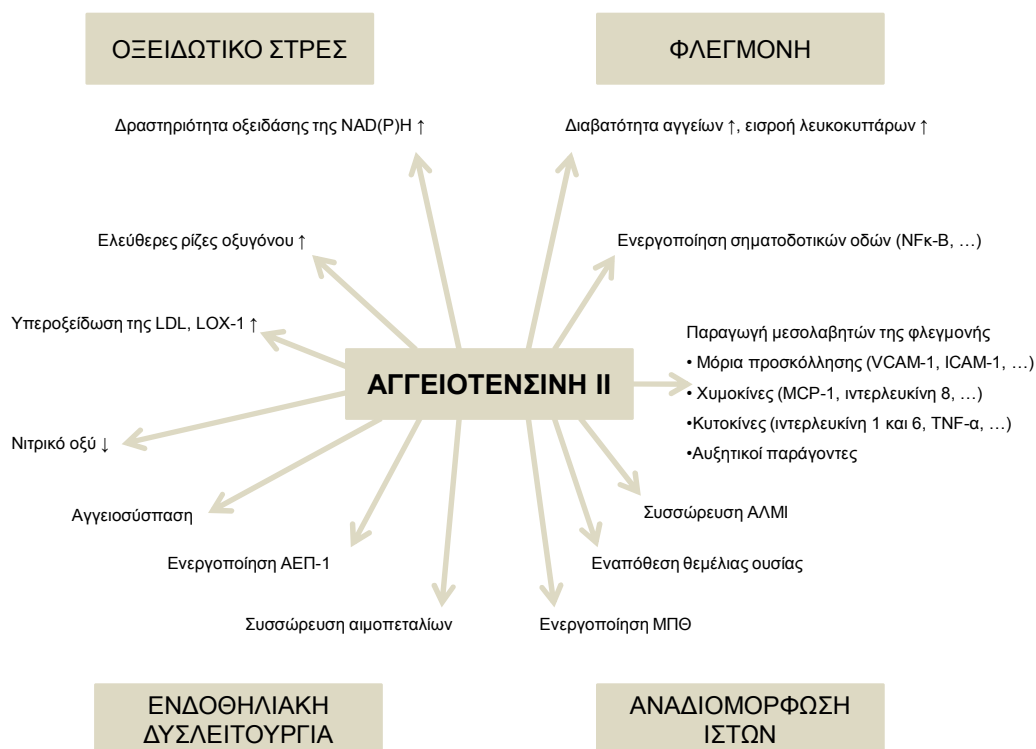
και προκαλεί ενδοκυττάρια απάντηση με φωσφορυλίωση μορίων σερίνης και τυροσίνης, που σχετίζονται στη συνέχεια με την ενεργοποίηση MAP κινασών. Υψηλά επίπεδα του αγγελιοφόρου mRNA του υποδοχέα έχουν βρεθεί στο μυοκάρδιο, τον εγκέφαλο, τον πλακούντα, ενώ χαμηλότερα επίπεδα στο νεφρό, το ήπαρ και το πάγκρεας. Μελέτες ανοσοφθορισμού σε φυσιολογικά κατεψυγμένα τμήματα μυοκαρδίου έδειξαν ότι ο υποδοχέας εντοπίζεται και στο υπενδοθήλιο των στεφανιαίων αγγείων.

Οι φυσιολογικές δράσεις του υποδοχέα είναι πολύ σημαντικές. Κατά πρώτο λόγο προσδίδει λειτουργικό ρόλο στην προρενίνη. Η προρενίνη συνδέεται *in vivo* με τον υποδοχέα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση αυτού.<sup>86, 87</sup> Τα επίπεδα προρενίνης είναι αυξημένα στην εγκυμοσύνη και το σακχαρώδη διαβήτη, όπου και σχετίστηκαν με την εμφάνιση αμφιβληστροειδοπάθειας.<sup>88</sup> Η παρουσία του υποδοχέα ρενίνης μπορεί να εξηγήσει την παραγωγή αγγειοτενσίνης II στους ιστούς ανεξάρτητα από το κυκλοφορούν ΣΡΑΑ. Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις της ρενίνης στο πλάσμα βρίσκονται στο επίπεδο των picomols, αλλά στους ιστούς και πιο συγκεκριμένα στο διάμεσο ιστό μπορούν να φτάσουν σε επίπεδα 10nM. Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις κυκλοφορούσας προρενίνης υπερβαίνουν αυτές της ενεργοποιημένης ρενίνης, που αποτελεί το 50-70% της συνολικής, ενώ στους διαβητικούς αγγίζει το 90%. Ως εκ τούτου, ο πιθανός αποκλεισμός της σύνδεσης του υποδοχέα με την (προ)ρενίνη και της ιστικής ενεργοποίησης του AGT, μπορεί να αποδειχθεί αποτελεσματικός μηχανισμός αποκλεισμού της συσσώρευσης ρενίνης στους ιστούς και αποκλεισμού του ΣΡΑΑ σε αρχικό επίπεδο.

### **ΣΡΑΑ και αθηρωμάτωση**

Η σημασία των κλασικών παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου, όπως η αυξημένη LDL χοληστερόλη, η υπέρταση, το κάπνισμα και ο σακχαρώδης διαβήτης, για τη δημιουργία και εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένη. Ωστόσο, η εντατική έρευνα τα τελευταία χρόνια έφερε στο φως δεδομένα για νέους σημαντικούς μηχανισμούς που συνδέονται με την αθηρωματική διαδικασία. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την αγγειακή φλεγμονή, την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και τις μεταβολές στην ενδοθηλιακή λειτουργία. Επιπλέον, κλινικά και πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του ΣΡΑΑ, με κύριο εκφραστή τη σύνδεση της αγγειοτενσίνης II με τον υποδοχέα AT1, παίζει κεντρικό ρόλο σε όλες τις προαναφερόμενες διαδικασίες (**εικόνα 4**).<sup>62</sup>

#### Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των σημαντικών επιδράσεων της αγγειοτενσίνης II στους μηχανισμούς που σχετίζονται με την αθηρωμάτωση



ICAM-1: ενδοκυττάρια μόρια προσκόλλησης, LOX-1: οξειδωμένος υποδοχέας της LDL τύπου λεκτίνης, MCP-1: πρωτεΐνες χημειοταξίας των μονοκυττάρων, ΑΛΜΙ: αγγειακές λείες μυϊκές ίνες, ΜΠΘ: μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας, ΑΕΠ: αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου.

Η παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη 1, ο TNF-α και κυρίως η ιντερλευκίνη 6, παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αθηρωμάτωσης.<sup>89</sup> Οι συγκεντρώσεις των κυκλοφορούντων κυτοκινών σχετίζονται με επιδεινωμένη πρόγνωση σε ασθενείς με ΣΝ.<sup>90, 91</sup> Τόσο η ιντερλευκίνη 6, όσο και ο υποδοχέας AT1 έχουν εντοπιστεί σε σταθερές και ασταθείς αθηρωματικές πλάκες, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο. Συγκεκριμένα, η ιντερλευκίνη 6 προκαλεί υπερέκφραση του AT1 υποδοχέα στα αγγεία,<sup>92</sup> ενώ η ενεργοποίηση του AT1 υποδοχέα αυξάνει τα επίπεδα της ιντερλευκίνης 6.<sup>93</sup> Επιπλέον, η εμμένουσα φλεγμονώδης κατάσταση φαίνεται να συμβάλλει στην

αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας και στην αύξηση του κινδύνου ρήξης αυτής.

Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας συνδέεται με την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας στο ινώδες περίβλημα της αθηρωματικής βλάβης.<sup>94</sup> Υπάρχουν δεδομένα ότι η αγγειοτενσίνη II εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας, τόσο άμεσα, όσο και μέσω αύξησης της παραγωγής ιντερλευκίνης 6.<sup>95</sup> Επιπλέον, η αγγειοτενσίνη II ενεργοποιεί τον οξειδωτικό πυρηνικό παράγοντα NF-κΒ, που δρα ως μεσολαβητής των φλεγμονωδών ερεθισμάτων,<sup>96</sup> αυξάνοντας την έκφραση των μορίων προσκόλλησης (ενδοκυττάρων και αγγειακών μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1, E-σελεκτίνης), των πρωτεϊνών χημειοταξίας των μονοκυττάρων (MCP-1) και της ιντερλευκίνης 8.<sup>97, 98</sup> Οι αναστολείς των AT υποδοχέων έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την ενεργοποίηση και την προκαλούμενη από την αγγειοτενσίνη II έκφραση του NF-κΒ ακόμα και σε υγιείς ενήλικες.<sup>44, 45, 99</sup> Επιπλέον, οι AMEA και οι αναστολείς των AT1 υποδοχέων μειώνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης.<sup>100, 101</sup> Σε μια διπλή τυφλή μελέτη που συμπεριέλαβε υπερτασικούς ασθενείς με αυξημένα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), η χορήγηση της ολμεσαρτάνης, ενός αναστολέα των AT1 υποδοχέων, μείωσε σημαντικά την αγγειακή φλεγμονή μετά από δίμηνη περίοδο θεραπείας.<sup>102</sup> Έτσι, η χρόνια φλεγμονώδης απάντηση που σχετίζεται με την αθηρωμάτωση φαίνεται να μεσολαβείται από την αγγειοτενσίνη II σε κάθε επίπεδο και μπορεί να τεθεί ως θεραπευτικός στόχος με την αναστολή του ΣΡΑΑ.

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίο και το περοξειδίο του υδρογόνου, ενισχύει και σταθεροποιεί την αθηρωματική διαδικασία. Η αγγειοτενσίνη II διεγείρει τη δραστηριότητα της NADP(H) και της οξειδάσης της ξανθίνης, που είναι οι κύριες πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου μέσα στο αγγειακό τοίχωμα.<sup>103</sup> Το υπεροξειδίο αντιδρά άμεσα με το οξειδίο του αζώτου (NO), που προέρχεται από το ενδοθήλιο, σχηματίζοντας περοξυνιτρίτη και τελικά προκαλώντας απελευθέρωση NO.<sup>104</sup> Η αγγειοτενσίνη II ευνοεί την οξείδωση της LDL χοληστερόλης και την έκφραση των οξειδωμένων LDL υποδοχέων τύπου λεπτίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα.<sup>8, 90, 105</sup> Οι οξειδωμένοι LDL υποδοχείς τύπου λεπτίνης στη συνέχεια προκαλούν την υπερέκφραση των AT1 υποδοχέων, οδηγώντας σε ένα δυσμενή φαύλο κύκλο ανατροφοδότησης και στην αυξημένη είσοδο οξειδωμένης LDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε ζώα με υπερχοληστερολαιμία η διαταραχή της ενδοθηλιακής λειτουργίας σχετίζεται με την υπερέκφραση των AT1 υποδοχέων και την παραγωγή υπεροξειδίου μέσω της αυξημένης οξειδάσης της NADP(H) στα βλαμμένα αγγεία, μηχανισμοί που μπορούν να επαναφερθούν στο φυσιολογικό μετά

από χορήγηση αναστολέων των AT υποδοχέων.<sup>106</sup> Το γεγονός ότι η συστηματική και νεφρική απάντηση στην έγχυση αγγειοτενσίνης II σε ανθρώπους καθορίζεται από τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης βρίσκεται σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα.<sup>107</sup> Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες ενισχύει την ιστική φλεγμονώδη διαδικασία και την ιστική βλάβη μέσω ενεργοποίησης της παραγωγής κυτοκινών. Η αναστολή του ΣΡΑΑ φαίνεται λοιπόν ότι μπορεί να βελτιώσει τη δραστηριότητα του NO σε διάφορες καταστάσεις μέσω της αναστολής της πρόκλησης οξειδωτικού στρες [ενεργοποίηση της οξειδάσης της NADP(H)] που οφείλεται στην αγγειοτενσίνη II.

### **Θεραπευτικές προεκτάσεις της αναστολής του ΣΡΑΑ**

*AMEA και αναστολείς AT1 υποδοχέων:* Ως αποτέλεσμα όλων των παραπάνω παρατηρήσεων, ο αποκλεισμός του ΣΡΑΑ αναδείχθηκε ως η προφανής και ελκυστική θεραπευτική επιλογή σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση. Τα πρώτα ευνοϊκά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της αναστολής του ΣΡΑΑ στην ενδοθηλιακή λειτουργία προέκυψαν από τη μελέτη Trial on Reversing Endothelial Dysfunction, η οποία έδειξε ότι η αναστολή του ACE σε ασθενείς με ΣΝ βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία.<sup>108</sup> Παρομοίως, ευεργετικά αποτελέσματα των AMEA επιβεβαιώθηκαν και σε μελέτες υπερτασικών ασθενών.<sup>109</sup> Σε αντίθεση με τα διουρητικά, ο αποκλεισμός των AT1 υποδοχέων με τη βαλσαρτάνη βελτίωσε την παραγωγή και απελευθέρωση NO σε υπερτασικούς ασθενείς, παρά την ισότιμη μείωση της αρτηριακής πίεσης.<sup>110</sup> Στην περιφερική κυκλοφορία η θεραπεία με τη ραμιπρίλη (AMEA) ή τη λοσαρτάνη (AT1 αναστολέας) βελτίωσαν τη σχετιζόμενη με το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή σε ασθενείς με ΣΝ μέσω αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας του NO.<sup>111</sup> Επιπλέον, μια μελέτη σε υπερτασικές μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έδειξε ότι η συχνότητα καρδιαγγειακών συμβαμάτων ήταν σημαντικά χαμηλότερη στις ασθενείς με βελτιωμένη ενδοθηλιακή λειτουργία ως αποτέλεσμα της θεραπείας σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς βελτιωμένη ενδοθηλιακή λειτουργία,<sup>112</sup> γεγονός που αποδεικνύει την προγνωστική αξία της αναστροφής της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Η αυξημένη συγκέντρωση των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων, τα οποία πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη σταθερότητα του αγγειακού ενδοθηλίου, έχει συσχετιστεί με βελτιωμένη πρόγνωση σε ασθενείς με ΣΝ.<sup>113</sup> Σε μια μικρή μελέτη που συμπεριέλαβε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, η χρήση αναστολέων των AT υποδοχέων αύξησε τον αριθμό των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων,<sup>114</sup> γεγονός που μπορεί να συνέβαλε στο καρδιαγγειακό όφελος αυτής της κατηγορίας των φαρμάκων.

Στους υψηλού κινδύνου ασθενείς χωρίς σημεία ή συμπτώματα καρδιακής ανεπάρκειας της μελέτης Heart Outcome Prevention Evaluation (HOPE) η χορήγηση ραμιπρίλης μείωσε σημαντικά τη συχνότητα θανάτου, OEM και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (22% μείωση του σχετικού κινδύνου).<sup>115</sup> Παρομοίως, στη μελέτη European Trial on Reduction of Cardiac Events with Perindopril in Stable Coronary Artery Disease (EUROPA) η χρήση περινδοπρίλης σχετίστηκε με 20% ελάττωση του σχετικού κινδύνου καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε πληθυσμό χαμηλού κινδύνου με χρόνια σταθερή ΣΝ.<sup>116</sup> Αντίθετα, η μελέτη Prevention of Events with Angiotensin Converting Enzyme Inhibition (PEACE) δεν κατάφερε να δείξει ότι ασθενείς με σταθερή ΣΝ και φυσιολογικό ή μειωμένο κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας αποκομίζουν θεραπευτικό όφελος από την προσθήκη ΑΜΕΑ στην κλασική θεραπεία.<sup>117</sup> Η αποτυχία των ΑΜΕΑ να επιδείξουν όφελος στη μελέτη αυτή φαίνεται να οφείλεται στη χαμηλή συχνότητα των σκληρών καρδιαγγειακών τελικών σημείων, όπως ο καρδιαγγειακός θάνατος και το OEM, και στις χαμηλές τιμές της LDL χοληστερόλης των συμμετεχόντων, πολλοί από τους οποίους ελάμβαναν στατίνη (**Πίνακας 2**).

Το ερώτημα κατά πόσο οι αναστολείς των ΑΤ υποδοχέων έχουν παρόμοιες επιδράσεις με τους ΑΜΕΑ στην αθηρωματική αγγειακή βλάβη παραμένει αναπάντητο. Σε υπερτασικούς ασθενείς της μελέτης LIFE η θεραπεία με λοσαρτάνη σχετίστηκε με 13% μείωση του σχετικού κινδύνου για το συνδυασμένο τελικό σημείο (θάνατος, OEM, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο),<sup>118</sup> γεγονός που δείχνει ότι μπορεί αυτό να οφείλεται σε ευνοϊκή δράση στην αθηρωματική αγγειακή νόσο.

*Αναστολείς ρενίνης:* Η προοπτική της αναστολής της ρενίνης ως στόχου αποκλεισμού του ΣΡΑΑ τέθηκε αρχικά προ 30 ετών, καθώς αυτή αποτελεί το αρχικό και σηματοδοτικό σημείο του ΣΡΑΑ.<sup>119</sup> Η λογική της αναζήτησης ενός αναστολέα της είναι πολυδιάστατη. Είναι γνωστό ότι ρενίνη αποτελεί το σημείο καθορισμού του βαθμού ενεργοποίησης του ΣΡΑΑ.<sup>120</sup> Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα της ενεργοποιημένης ρενίνης είναι ο πιο ευαίσθητος δείκτης ενεργοποίησης του ΣΡΑΑ. Επιπλέον, η συσχέτιση μεταξύ της διαβητικής μικροαγγειοπάθειας και των επιπέδων προρενίνης στο πλάσμα είναι ισχυρή.<sup>121</sup>



**Πίνακας 2: Σύγκριση τριών μεγάλων κλινικών μελετών που διερεύνησαν την επίδραση της αναστολής του ACE στη συχνότητα καρδιαγγειακών συμβαμάτων**

	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	ΕΤΗ	ΣΥΝΘΕΤΟ ΤΕΛΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ		ΜΗ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ	
				Συχνότητα	Μείωση σχετικού κινδύνου	Συχνότητα	Μείωση σχετικού κινδύνου
HOPE	Υψηλού κινδύνου (n=9297) (αγγειακή νόσος ή διαβήτη)	Ραμιπρίλη 10mg ανά ημέρα έναντι εικονικού φαρμάκου	5	14% έναντι 17.8%	22% (14-30)	9.9% έναντι 12.3%	20% (10-30)
EUROPA	Χαμηλού κινδύνου (n=12218) (σταθερή ΣΝ)	Περινδοπρίλη 8mg ανά ημέρα έναντι εικονικού φαρμάκου	4.2	8% έναντι 9.9%	20% (9-29)	4.8% έναντι 6.2%	22% (10-33)
PEACE	Χαμηλού κινδύνου (n=8290) (σταθερή ΣΝ)	Τρανδολαπρίλη 4mg ανά ημέρα έναντι εικονικού φαρμάκου	4.8	21.9% έναντι 22.5%	4% (-6-12)	5.3% έναντι 5.3%	0 (-20-17)

Οι αναστολείς της ρενίνης έχουν υψηλή ευαισθησία στην αναστολή της ουσίας αυτής, γεγονός που μειώνει τις πιθανότητες ανεπιθύμητων παρενεργειών και αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον ο αποκλεισμός του ΣΡΑΑ στο αρχικό στάδιο ενεργοποίησης (επίπεδο ρενίνης) αναμένεται να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα αγγιοτενσίνης I, βραδυκινίνης, αγγιοτενσίνης II και αλδοστερόνης.<sup>120</sup> Θεωρητικά, η αναστολή της ρενίνης μειώνει και τις ανεπιθύμητες ενέργειες που αποδίδονται στη βραδυκινίνη και την ουσία P, όπως είναι ο βήχας και το αγγειοοίδημα, συμπτώματα που εμφανίζονται με τη χρήση ΑΜΕΑ. Καθώς πολλοί από τους αναστολείς των ΑΤ1 υποδοχέων προκαλούν αύξηση των επιπέδων αγγιοτενσίνης II, οι αναστολείς ρενίνης επιφέρουν μείωση. Είναι άλλωστε άγνωστες οι πιθανές βλαπτικές επιδράσεις των αυξημένων συγκεντρώσεων αγγιοτενσίνης II (μέσω των υποδοχέων ΑΤ2), ακόμα και αν είναι αποκλεισμένοι οι ΑΤ1 υποδοχείς.

Με βάση αυτό το θεωρητικό υπόβαθρο, ένας άμεσος αναστολέας της ρενίνης (aliskiren) έχει πρόσφατα αναγνωριστεί από Διεθνείς Οργανισμούς Φαρμάκων (πχ. FDA) για τη θεραπεία της υπέρτασης. Προκαταρκτικά αποτελέσματα έχουν δείξει ότι το φάρμακο είναι καλά ανεκτό και αναστέλλει το ΣΡΑΑ με τρόπο δόσοεξαρτώμενο.<sup>120</sup> Στο πεδίο της υπέρτασης τουλάχιστον μια μελέτη έδειξε ότι ο αναστολέας της ρενίνης προκάλεσε αποτελεσματική μείωση της αρτηριακής πίεσης,<sup>122</sup> ακόμα και όταν συνδυάστηκε με βαλσαρτάνη.<sup>123</sup> Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για τις καρδιαγγειακές επιδράσεις των φαρμάκων αυτών σε ασθενείς με στεφανιαία αθηρωμάτωση. Στη μελέτη ALLAY, που βρίσκεται σε εξέλιξη, θα γίνει σύγκριση του φαρμάκου με τη λοσαρτάνη μετά από 9μηνη χορήγηση και με τελικό σημείο τη μεταβολή της μάζας της αριστερής κοιλίας, ενώ στη μελέτη ALOFT θα προστεθεί στην ιδανική θεραπεία ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και κλάση II-IV κατά ΝΥΗΑ.

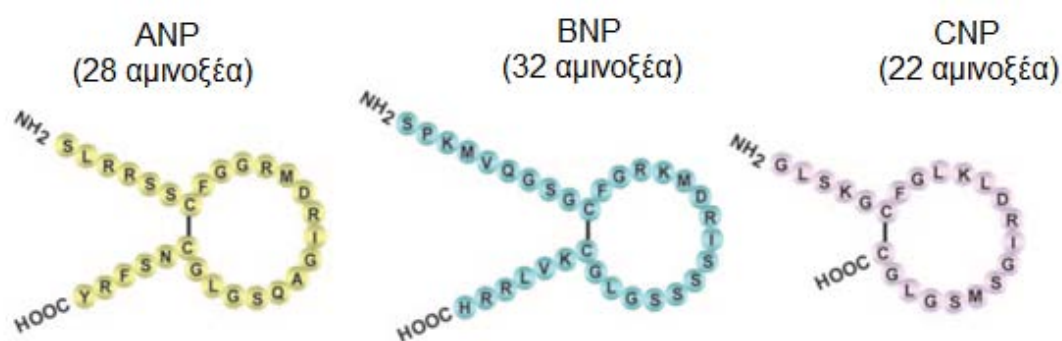
## **V. Το σύστημα των νατριουρητικών πεπτιδίων (ΣΝΠ)**

### ***Γενικά χαρακτηριστικά πεπτιδίων και υποδοχέων του ΣΝΠ***

Το σύστημα των νατριουρητικών πεπτιδίων (ΣΝΠ) αποτελείται από μια ομάδα πεπτιδικών ορμονών, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της νεφρικής, καρδιαγγειακής, ενδοκρινικής και σκελετικής ομοιόστασης. Το κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο (ANP) ανακαλύφθηκε ως δραστικό μόριο το 1981 από τους de Bold et al.<sup>124</sup>

Είναι ένα πεπτιδίο με 28 αμινοξέα στους ανθρώπους, με μια χαρακτηριστική μορφή που δημιουργείται από την ύπαρξη μιας γέφυρας κυστίνης που συνδέει τις θέσεις 7 και 23 (**εικόνα 5**). Το εγκεφαλικό νατριουρητικό πεπτιδίο (BNP) αντίθετα αποτελείται από 32 αμινοξέα. Έχει παρόμοια δομή με το ANP, αλλά εμφανίζει ιδιαίτερα αυξημένη ετερογένεια μεταξύ των ειδών σε σύγκριση με το ANP. Το CNP, αποτελούμενο από 22 αμινοξέα, περιέχει ένα τυφλό καρβοξυτελικό άκρο κάτω από τη δεύτερη θέση της γέφυρας της κυστίνης.

**Εικόνα 5. Βασική δομή των ανθρώπινων νατριουρητικών πεπτιδίων**

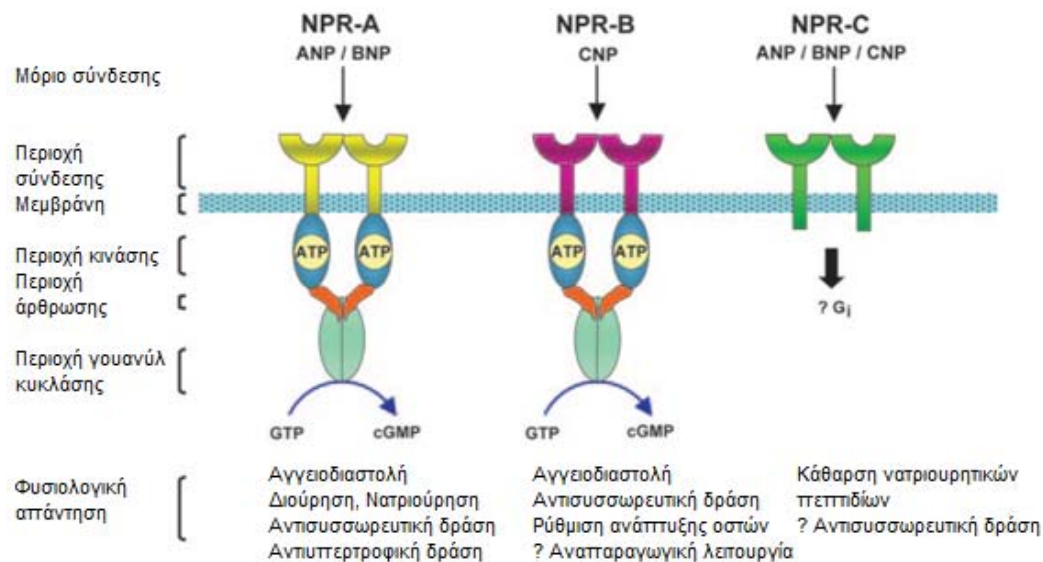


Τα ANP και BNP παράγονται κυρίως στα μυϊκά κύτταρα του μυοκαρδίου. Το ANP δείχνει μια εκλεκτικότητα στην έκφραση, παραγόμενο περισσότερο στους κόλπους από ότι στις κοιλίες, ενώ το BNP εκφράζεται περισσότερο ομοιόμορφα στον καρδιακό μυ. Το ANP παράγεται επίσης στον υποθάλαμο, όπου ενέχεται στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, τη δραστηριότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, την έκκριση βαζοπρεσίνης, τη ρύθμιση της επιθυμίας για πρόσληψη ύδατος και την καρδιαγγειακή ομοιόσταση. Αντίθετα, το BNP παράγεται και στον εγκέφαλο ορισμένων ειδών (χοίρος, σκύλος), χωρίς όμως να έχει ξεκαθαριστεί η δράση του εκεί. Το CNP παράγεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο αναπαραγωγικό σύστημα, στα οστά και στο ενδοθήλιο των αγγείων.

Υπάρχουν 3 διαφορετικοί τύποι υποδοχέων των ΝΠ, ο καθένας από τους οποίους διατρέχει την κυτταρική μεμβράνη σε όλο της το πάχος. Ο υποδοχέας A (NPRA) είναι επίσης γνωστός ως ειδική γουανυλικυκλάση A. Αποτελεί τον υψηλής ευαισθησίας υποδοχέα τόσο για το ANP, όσο και για το BNP. Η σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα φαίνεται στην **εικόνα 6**. Ο NPRA έχει ένα γλυκοζυλιωμένο, εξωκυτταρικό τμήμα που συνδέεται με το υδρόφοβο διαμεμβρανικό μέρος του

υποδοχέα, ένα μη καταλυτικό συνδεόμενο με το ATP τμήμα σε μια εγγύς ενδοκυττάρια θέση του μορίου, που φαίνεται ότι ρυθμίζει τη δραστηριότητα του υποδοχέα, και ένα μικρό τμήμα άρθρωσης. Το καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα περιέχει την ειδική γουανυλικυκλάση, που αποτελεί το καταλυτικό τμήμα του NPRA. Η επαφή του NPRA με το ANP ή το BNP προκαλεί μορφολογική μετατροπή του τμήματος της κινάσης, ώστε μειώνεται η τονική αναστολή της δραστηριότητας της γουανυλικυκλάσης και αυξάνεται η παραγωγή cGMP. Ο NPRB εμφανίζει παρόμοια δομή με τον NPRA και συνδέεται εκλεκτικά με το CNP. Ο NPRC, που ονομάζεται και υποδοχέας εκκαθάρισης, έχει ένα εξωκυττάριο τμήμα παρόμοιο με αυτό των άλλων 2 υποδοχέων. Αυτό συνδέεται με ένα μονό διαμεμβρανικό τμήμα και καταλήγει στο ενδοκυττάριο τμήμα που αποτελείται μόνο από 37 αμινοξέα. Ο NPRC συνδέεται με μεγάλη ευαισθησία και με τα τρία νατριουρητικά πεπτιδία, καθώς και με άλλα πεπτιδία με ποικίλη δομή και λειτουργικότητα. Ο κύριος ρόλος του NPRC είναι η δέσμευση και αποδόμηση των νατριουρητικών πεπτιδίων στον εξωκυττάριο χώρο.<sup>125</sup>

### Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της δομής και των γνωστών λειτουργιών των νατριουρητικών υποδοχέων



Οι 3 υπότυποι των υποδοχέων των νατριουρητικών πεπτιδίων διαφέρουν στη δομή, το βιολογικό ρόλο και τις ιδιότητες σύνδεσης. Τα επιμέρους δομικά χαρακτηριστικά των NPRA και NPRC έχουν μελετηθεί, αποκαλύπτοντας σημαντικές

λεπτομέρειες για τις ιδιότητες σύνδεσης με τα μόρια που τους διεγείρουν. Επιπλέον έχει αναλυθεί η γενετική δομή του NPRA σε ποντίκια και ανθρώπους, του NPRB σε ανθρώπους και του NPRC σε ποντίκια και ανθρώπους. Λίγα είναι ωστόσο γνωστά σε ότι αφορά τους μηχανισμούς ρύθμισης των υποδοχέων αυτών.

### ***Ο φυσιολογικός ρόλος των πεπτιδίων του ΣΝΠ***

Όλα τα βιολογικώς ενεργά πεπτιδία της οικογένειας των νατριουρητικών ορμονών μοιράζονται τις ίδιες φυσιολογικές λειτουργίες, που περιλαμβάνουν διουρητικές, νατριουρητικές και χαλαρωτικές των λείων μυικών ινών επιδράσεις, καθώς και περίπλοκες επιρροές στο ορμονικό, νευρικό και ανοσολογικό σύστημα.<sup>126</sup> Έχουν αναγνωρισθεί και άλλες σημαντικές επιδράσεις, το σύνολο των οποίων στοχεύουν στην προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος από τις συνέπειες της υπερφόρτωσης όγκου και πίεσης (**πίνακας 3**).

### ***Ο κλινικός ρόλος των πεπτιδίων του ΣΝΠ***

Τα πεπτιδία του ΣΝΠ κατέχουν μια εξαιρετική διαγνωστική και σημαντική θεραπευτική αξία. Από την ανάπτυξη των πρώτων μεθόδων μέτρησης του ANP<sup>127, 128</sup> και την τεκμηρίωση της σημασίας του ΣΝΠ στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, τα νατριουρητικά πεπτιδία έχουν μελετηθεί στο πλαίσιο της παθοφυσιολογίας και θεραπείας της νόσου. Η συγκέντρωση των νατριουρητικών πεπτιδίων στο πλάσμα είναι μικρότερη σε νορμοτασικούς με θετικό οικογενειακό ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης, ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις έχουν συσχετισθεί με καλύτερη διαστολική λειτουργία του μυοκαρδίου.<sup>129, 130</sup> Ο προστατευτικός ρόλος των νατριουρητικών πεπτιδίων σε υγιείς ενήλικες επιβεβαιώθηκε και από την άμεση ενδοφλέβια έγχυση αυτών, η οποία βελτιώνει τη διαστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας.<sup>131, 132</sup> Αντίθετα, σε υπερτασικούς ασθενείς έχουν εντοπισθεί παθολογικές συγκεντρώσεις νατριουρητικών πεπτιδίων.<sup>127, 128</sup> Στην υπερβολαιμική υπέρταση έχουν παρατηρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις ANP, η έκκριση του οποίου ενεργοποιείται κυρίως από μηχανικά ερεθίσματα τάσης στον αριστερό κόλπο.<sup>133</sup> Επιπλέον, το BNP αυξάνεται ανάλογα με τη βαρύτητα της αρτηριακής υπέρτασης, ειδικά όταν συνυπάρχει υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, κυρίως λόγω αύξησης στην κοιλιακή μάζα και την επακόλουθη αυξημένη σύνθεση του BNP από τον ιστό των κοιλιών.<sup>126</sup>

### Πίνακας 3. Φυσιολογικές επιδράσεις των νατριουρητικών πεπτιδίων

Νατιούρηση	↑
Διούρηση	↑
Φλεβικός τόνος	↓
Αρτηριακός τόνος	↓
Καρδιακή και αγγειακή υπερτροφία και αναδιαμόρφωση	↓
Ενεργοποίηση συμπαθητικού νευρικού συστήματος	↓
Ενεργοποίηση παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος	↑
Συγκέντρωση αλδοστερόνης	↓
Ίνωση	↓
Έκκριση ρενίνης	↓
Ρυθμός σπειραματικής διήθησης και κλάσμα διήθησης	↑
Λιπόλυση	↑
Φλεγμονή	↓
Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων	↓

Αυξημένες συγκεντρώσεις νατριουρητικών πεπτιδίων έχουν αναφερθεί στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, όπου η αύξηση των συγκεντρώσεων είναι ανάλογη του μεγέθους του εμφράγματος και της έκτασης της κοιλιακής δυσλειτουργίας.<sup>134</sup> Η αύξηση των επιπέδων των νατριουρητικών πεπτιδίων αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου σε ασθενείς με ασταθή, αλλά και με σταθερή ΣΝ.<sup>134, 135</sup> Επιπλέον, αποτελεί ισχυρό και ανεξάρτητο δείκτη εμφάνισης καρδιακής ανεπάρκειας ή θανάτου στα οξέα στεφανιαία επεισόδια και στη χρόνια ΣΝ.<sup>134, 135</sup> Έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση των νατριουρητικών πεπτιδίων στα αθηρωματικά αγγεία του

ανθρώπου, γεγονός που δείχνει ότι η αθηρωματική πλάκα μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση αυτή.<sup>136</sup>

Η μέτρηση των BNP και NT-proBNP έχει αναδειχθεί ως σημαντικότερο κλινικό εργαλείο στην αξιολόγηση και αντιμετώπιση της καρδιακής ανεπάρκειας.<sup>4, 137</sup> Η σημασία της μέτρησης των παραπάνω ουσιών επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα μιας μετα-ανάλυσης, η οποία απέδειξε την υψηλή διαγνωστική ακρίβεια και κλινική συσχέτιση των BNP και NT-proBNP τόσο στη χρόνια όσο και στην οξεία καρδιακή ανεπάρκεια.<sup>138</sup> Μια ακόμη ανασκόπηση έδειξε ότι τα νατριουρητικά πεπτιδία αποτελούν ισχυρό ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη στην οξεία και χρόνια νόσο.<sup>139</sup> Οι υπόλοιπες κλινικές εφαρμογές της μέτρησης των νατριουρητικών πεπτιδίων βρίσκονται υπό διερεύνηση και περιλαμβάνουν τη διάγνωση της ασυμπτωματικής κοιλιακής δυσλειτουργίας στο γενικό πληθυσμό και την κατευθυνόμενη θεραπεία.

### ***Η ρύθμιση των υποδοχέων του ΣΝΠ***

Η δραστηριότητα του NPRA, η έκφραση του γονιδίου του, καθώς και η ρύθμιση της δραστηριότητας του προαγωγέα του ρυθμίζονται ανάδρομα από το ANP (ομόλογη προς τα κάτω ρύθμιση) μέσω ενός μηχανισμού που φαίνεται να απαιτεί cGMP.<sup>140</sup> Η δράση αυτή του ANP επιτυγχάνεται με την ύπαρξη ειδικής γενετικής αλληλουχίας μεταξύ των θέσεων -1575 και -1290, που ρυθμίζει τη δραστηριότητα του cGMP.<sup>141</sup> Ο υποδοχέας NPRA ρυθμίζεται επίσης από την 1,25 υδροξυβιταμίνη D μέσω μιας ρυθμιστικής θέσης του προαγωγέα στο -484. Αυτή η συσχέτιση μπορεί να σχετίζεται με τις ευεργετικές επιδράσεις της βιταμίνης D στο καρδιαγγειακό.<sup>142</sup> Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο του NPRA μειώνει την έκφραση του υπο την επίδραση της αγγειοτενσίνης II<sup>143</sup> και την ενισχύει μετά από ωσμωτικό ερεθισμό.<sup>144</sup> Η τελευταία δράση περιλαμβάνει τη συμμετοχή του NO και του p38 MAPK.<sup>145</sup>

Η σημασία του NPRA στη φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα μελετών σε ζώα, όπου τεχνητά μεταβλήθηκε η έκφραση του υποδοχέα. Η ομόζυγη έλλειψη του NPRA οδήγησε σε ανθεκτική στο άλας υπέρταση, μυοκαρδιακή υπερτροφία και αυξημένο κίνδυνο αιφνιδίου θανάτου.<sup>146, 147</sup> Η μυοκαρδιακή υπερτροφία στα ποντίκια έχει συσχετιστεί με την αυξημένη δραστηριότητα του ανταλλάκτη Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> NHE1.<sup>148</sup> Η αρτηριακή πίεση στα ζώα αυτά είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου του NPRA.<sup>149</sup> Η απώλεια του γονιδίου του NPRA οδηγεί στην απώλεια πρακτικά όλων των καρδιαγγειακών επιδράσεων του ANP και BNP, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα

παραπάνω πεπτίδια ασκούν τη δράση τους σχεδόν αποκλειστικά μέσω αυτού του υποτύπου υποδοχέα των νατριουρητικών πεπτιδίων.<sup>150</sup> Όπως και σε ποντίκια που λείπει το ANP, έτσι και αυτά με έλλειψη NPRA εμφανίζουν φυσιολογική ικανότητα απάντησης στο νάτριο των τροφών, αλλά μειωμένη ικανότητα νατριουρητικής απάντησης σε οξεία αύξηση του ενδαγγειακού όγκου.<sup>151, 152</sup> Αυτά τα ποντίκια εμφανίζουν και αυξημένη προδιάθεση για καρδιακή ανεπάρκεια μετά από τη δημιουργία αναστόμωσης μεταξύ αορτής και κάτω κοίλης φλέβας.<sup>153</sup> Η κοιλιακή υπερτροφία που αναπτύσσεται στα προαναφερθέντα πειραματόζωα, φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της απώλειας της αντιυπερτροφικής δράσης του συνδεδεμένου NPRA στην καρδιά. Ο φαρμακολογικός έλεγχος της αρτηριακής υπέρτασης στα ζώα αυτά δε δύναται να προκαλέσει υποστροφή της υπερτροφίας και τα ποντίκια αντιδρούν σε συμπίεση της αορτής με αύξηση του πάχους της αριστερής κοιλίας και ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου του ANP.<sup>154</sup> Υπερέκφραση των NPRA ειδικά στο μυοκάρδιο NPRA -/-ποντικίων οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των μυοκυττάρων και την έκφραση του γονιδίου του ANP.<sup>155</sup> Μάλιστα η στοχευμένη καταστροφή του NPRA γονιδίου στην καρδιά προκαλεί ήπια υπερτροφία και αυξημένη έκφραση εμβρυικού γενετικού υλικού (πχ. ANP, α σκελετική ακτίνη, βαριές άλυστοι β-μυοσίνης). Η αρτηριακή πίεση είναι μειωμένη σε αυτές τις περιπτώσεις, ως αποτέλεσμα ίσως της περιφερικής δράσης των αυξημένων συγκεντρώσεων ANP.<sup>156</sup> Η εκλεκτική καταστροφή του γονιδίου του NPRA στις λείες μυϊκές ίνες δεν επιδρά στην αρτηριακή πίεση ηρεμίας, αλλά αποτρέπει την υποτασική δράση που εμφανίζεται μετά από έγχυση ANP.<sup>157</sup> Η οξεία αύξηση του ενδαγγειακού όγκου σε μοντέλα ποντικίων χωρίς NPRA ακολουθείται από αιφνίδια και σημαντική αύξηση της αρτηριακής πίεσης, λόγω έλλειψης των υποτασικών δράσεων του ενδογενούς ANP. Η εκλεκτική απενεργοποίηση του γονιδίου του NPRA στο ενδοθήλιο των αγγείων έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη υπέρτασης, μυοκαρδιακής υπερτροφίας και απώλειας της εξαρτημένης από το ANP συρρίκνωσης του ενδαγγειακού όγκου (μεταφορά όγκου στο διάμεσο χώρο).<sup>158</sup> Η απενεργοποίηση αυτή επίσης μειώνει τη βλάβη από την ισχαιμία/επαναγγείωση μέσω μείωσης της παραγωγής κBP-σελεκτίνης, μια δράση παρόμοια με αυτή του ανταγωνιστή του NPRA, του HS-142-1. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να φανεί χρήσιμη κλινικά ως προς τη μείωση της βλάβης επαναγγείωσης.<sup>159</sup>

Η παρουσία πολυμορφισμών στα γονίδια των NPRB και NPRC δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης του κλινικού ρόλου των υποδοχέων αυτών. Η δομική μορφολογία του NPRB γονιδίου έχει μελετηθεί και έχουν βρεθεί διάφορες περιοχές πολυμορφισμού, συμπεριλαμβανομένου ενός GT πολυμορφισμού επανάληψης, της C2077T αντικατάστασης στο εξόνιο 11 και μια έλλειψης 9bp στο εσόνιο 18.<sup>160-163</sup> Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι ο GT πολυμορφισμός επανάληψης σχετίζεται με την



υπέρταση, ενώ αντίθετα η I/D έλλειψη δε σχετίζεται με την υπέρταση ή το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.<sup>160-162</sup> Επιπλέον, δεν αναγνωρίστηκε συσχέτιση μεταξύ του C2077T πολυμορφισμού και του OEM.<sup>163</sup> Έχουν περιγραφεί διάφοροι πολυμορφισμοί του NPRC γονιδίου, όπως ο C(-55)A πολυμορφισμός στην περιοχή του προαγωγέα και ο VNTR πολυμορφισμός μιας δνουκλεοτιδικής επανάληψης 4bp άνωθεν της κύριας εναρκτήριας περιοχής μετάφρασης του γονιδίου στην 5' ανοδική περιοχή του NPRC.<sup>164-172</sup> Ο C(-55)A και ο VNTR πολυμορφισμός έχουν συσχετιστεί με την υπέρταση και τη σχετιζόμενη με την παχυσαρκία υπέρταση. Ο C(-55)A πολυμορφισμός σχετίστηκε με μικρότερες συγκεντρώσεις ANP και υψηλότερη συστολική και μέση αρτηριακή πίεση.<sup>168, 171</sup> Επιπλέον, οι φορείς του C αλληλίου στο γενικό πληθυσμό εμφανίζουν μικρότερη επίπτωση της παχυσαρκίας και της συσσώρευσης κοιλιακού λίπους σε σύγκριση με τους φορείς του A(-55)A. Το C αλληλίο του NPRC γονιδίου σχετίζεται επίσης με το οικογενειακό ιστορικό υπέρτασης.<sup>169</sup> Ωστόσο, νεότερα δεδομένα δεν επιβεβαιώνουν ότι το C(-55) αλληλίο προβλέπει τις συγκεντρώσεις των νατριουρητικών πεπτιδίων στην καρδιακή ανεπάρκεια.<sup>166</sup>

## VI. Φλεγμονώδης αντίδραση - η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)

Ο μηχανισμός της φλεγμονής συμβάλλει σε διάφορα στάδια της παθογένεσης της ΣΝ, συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας διαδικασίας αθηρογένεσης και των οξέων αθηροθρομβωτικών επεισοδίων, που προκαλούν ισχαιμική νέκρωση μετά από OEM ή μυοκαρδιακή βλάβη μετά από ισχαιμία.<sup>90, 173-176</sup> Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), η κλασική πρωτεΐνη οξείας φάσης, είναι ο πιο ευρέως μελετημένος δείκτης της φλεγμονής.<sup>177</sup> Από την πρώτη παρατήρηση της συσχέτισης ακόμα και ελάχιστα αυξημένων ποσοτήτων CRP με την καρδιαγγειακή πρόγνωση σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη,<sup>178, 179</sup> πραγματοποιήθηκαν εκατοντάδες εργασίες που περιελάμβαναν τη CRP ως δείκτη πρόληψης, διάγνωσης ή θεραπείας.<sup>175</sup> Σε γενικές γραμμές η αύξηση της βασικής τιμής της CRP έχει συσχετισθεί με αύξηση του κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο (μη θανατηφόρο OEM ή στεφανιαίο θάνατο).<sup>180</sup> Επίσης, η CRP είναι γνωστό εδώ και 25 χρόνια ότι συνδέεται με την LDL<sup>181, 182</sup> και ανιχνεύεται στις αθηρωματικές πλάκες.<sup>183</sup> Οι παρατηρήσεις αυτές έγειραν την υποψία πιθανού αιτιολογικού ρόλου της CRP, παρόλο που αυτό σήμερα τίθεται υπό αμφισβήτηση.<sup>184-</sup>

<sup>186</sup> Υπάρχει επίσης αμφιβολία σχετικά με την αξία μιας μοναδικής μέτρησης της CRP στη μακροχρόνια πρόγνωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων.<sup>187, 188</sup> Είναι πιθανόν ότι ανεξάρτητα από τις μακροχρόνια σταθερές τιμές CRP, η οξεία αύξηση της στο OEM μπορεί να επιδρά στη βαρύτητα και την εξέλιξη της ισχαιμικής βλάβης.<sup>189</sup>

Ο όρος υψηλής ευαισθησίας CRP (hsCRP) χρησιμοποιείται περισσότερο στη σύγχρονη βιβλιογραφία. Αναφέρεται στη μέτρηση της CRP στον ορό ή στο πλάσμα με τη χρήση ανοσολογικών μεθόδων, οι οποίες υπολογίζουν με επαρκή ευαισθησία τη CRP καθόλο το φάσμα της διακύμανσής της, σε αντίθεση με παλαιότερες τεχνικές που είχαν ως όρια μέτρησης 2-10mg/L. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η hsCRP είναι η ίδια η CRP και όχι ένα διαφορετικό μόριο που σχετίζεται με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η hsCRP είναι ο ίδιος εξαιρετικά ευαίσθητος και καθόλου ειδικός συστηματικός δείκτης φλεγμονής, λοίμωξης, ιστικής βλάβης, μη φυσιολογικού στρες όπως και η CRP, η οποία έχει μελετηθεί πειραματικά και κλινικά εδώ και 75 περίπου χρόνια.

### ***Η δομή της CRP***

Η CRP είναι μια μη γλυκοζυλιωμένη κυκλοφορούσα πρωτεΐνη του πλάσματος, η οποία σε συνδυασμό με το πολύ στενά σχετιζόμενο αμυλοειδές P του πλάσματος (SAP), αποτελούν την ομάδα των πεντραξινών, πρωτεϊνών που ανήκουν στην υπεροικογένεια των λεκτινών.<sup>190, 191</sup> Κάθε πεντραξίνη αποτελείται από 5 πανομοιότυπες υποομάδες που διατάσσονται σε μορφή συμμετρικού πενταμερούς (δισκοειδής μορφή) και περιέχουν ειδικές θέσεις σύνδεσης εξαρτώμενες από το ασβεστόιο. Τα μόρια του ασβεστίου είναι πάντα παρόντα *in vivo* και είναι απαραίτητα για όλες τις συνδέσεις του μορίου της CRP που συμβαίνουν κατά τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, για τη σταθερότητα του προαγωγέα του μορίου και γενικά για την ακεραιότητα του πενταμερούς.<sup>192</sup>

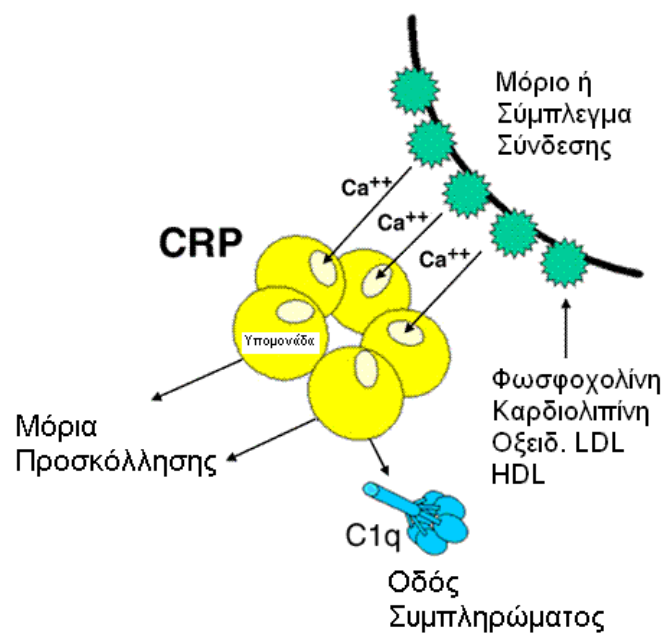
Σε περίπτωση απώλειας του ασβεστίου, ακόμα και σε περιβάλλον με φυσιολογικό pH και ιοντικό φορτίο, η CRP καταβολίζεται ταχέως, χάνοντας τη συνδετική της ικανότητα, αποδομείται σε προαγωγείς που γρήγορα μεταβολίζονται και γίνεται ευάλωτη σε πρωτεόλυση. Αντιθέτως, η CRP που βρίσκεται σε περιβάλλον με φυσιολογικές συνθήκες ασβεστίου, pH και ιοντικού φορτίου είναι ιδιαίτερα σταθερή ως μόριο. Η CRP δεν αποσυντίθεται στους προαγωγείς της ακόμα και με την παρουσία ισχυρότατων ανιονικών ενώσεων, όπως το δωδεκυλθειικό νάτριο, εκτός αν έρθει σε θερμοκρασία βρασμού. Η CRP επίσης είναι σταθερή στο πλάσμα γεγονός

που βελτιώνει σημαντικά τη χρησιμότητά της ως κλινικό δείκτη.<sup>193</sup> Για αυτό το λόγο μάλιστα η αναζήτηση καταλοίπων της CRP (υποομάδες μετά από καταβολισμό ή πρωτεολυτικά κατάλοιπα), γνωστά με το όνομα «τροποποιημένη CRP», δεν έχουν καμία αξία στην κλινική πράξη, καθώς η in vivo παρουσία τους είναι αμφίβολη.

### Οι θέσεις σύνδεσης της CRP

Η CRP ανακαλύφθηκε και ονομάστηκε από την ιδιότητά της να συνδέεται με τη σωματική C-πολυσακχαρίδη του πνευμονόκοκκου, στην οποία αναγνωρίζει τους υποδοχείς φωσφοχολίνης.<sup>194</sup>

### Εικόνα 7. Μηχανισμός δράσης της CRP



Το πενταμερές μόριο της CRP συνδέεται με τη βοήθεια του ασβεστίου με ουσίες (φωσφοχολίνη, κτλ) που εκφράζονται σε νεκρά ή βλαμμένα κύτταρα (συμπλέγματα σύνδεσης) και προκαλεί την επέκταση της φλεγμονώδους αντίδρασης μέσω κινητοποίησης των διαλυτών μορίων προσκόλλησης και της κλασικής οδού του συμπληρώματος.

Η φωσφοχολίνη αποτελεί μια φυσιολογική ουσία με την οποία συνδέεται με πολύ υψηλή ένταση η CRP, και που ανευρίσκεται σε πολλές βιολογικές δομές ως το πολικό άκρο της φωσφατιδυλχολίνης των κυτταρικών μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος (εικόνα 7). Ωστόσο η CRP δε συνδέεται με όλα τα μόρια που περιέχουν φωσφοχολίνη, παρά μόνο με αυτά που οι υποδοχείς είναι διαθέσιμοι ή σε κατάλληλη στερεοχημική διάταξη. Με αυτόν τον τρόπο η CRP συνδέεται με νεκρά ή βλαμμένα κύτταρα, στα οποία βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες η λυσοφωσφατιδυλχολίνη, αλλά όχι στα υγιή κύτταρα.<sup>195</sup> Η σύνδεση της CRP με τα αποπτωτικά κύτταρα είναι αμφιλεγόμενη με τα πιο σημαντικά δεδομένα να δείχνουν ότι συνδέεται μόνο με τα όψιμα αποπτωτικά, τα οποία είναι πρακτικά νεκρωμένα.<sup>196-198</sup> Επιπλέον η CRP συνδέεται με τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια,<sup>197</sup> τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων,<sup>199</sup> την τροποποιημένη LDL,<sup>200</sup> τη β-VLDL, τη φυσιολογική κυκλοφορούσα VLDL<sup>201</sup> και με μικρά μόρια πυρηνικών ριβοπρωτεϊνών (που δεν περιέχουν φωσφοχολίνη), τα οποία εκφράζονται σε νεκρά ή βλαμμένα κύτταρα.<sup>202, 203</sup> Η σύνδεση της CRP με τα μακρομόρια έχει παρόμοιες επιδράσεις με τη σύνδεση αντισωμάτων-αντιγόνων, καθώς προκαλεί την κινητοποίηση διαλυμένων μορίων προσκόλλησης και της κλασικής οδού του συμπληρώματος.<sup>204-206</sup> Κατ' αναλογία με τα αντισώματα είναι πιθανόν η CRP να συμβάλλει στην άμυνα του ξενιστή έναντι της λοίμωξης και στην ευόδωση της φλεγμονώδους ιστικής βλάβης.

### **Λειτουργίες της ανθρώπινης CRP**

Η φυσιολογικές λειτουργίες της CRP και ο ρόλος της στη παθογένεση των ασθενειών είναι σε γενικές γραμμές άγνωστος. Οι επιδράσεις της έλλειψης, της απώλειας λειτουργίας ή της αναστολής της CRP δεν έχουν ακόμα ελεγχθεί. Η διατήρηση εξελικτικά και φυλογενετικά της δομής της CRP δείχνει ότι παίζει ευεργετικό ρόλο, ο οποίος πρέπει να σχετίζεται με την απόκτηση ενδογενούς ανοσίας έναντι της λοίμωξης και με την απομάκρυνση των βλαμμένων αυτόλογων κυττάρων και λιπιδίων.<sup>191, 207, 208</sup>

Κάθε λειτουργία που συνδέεται με τη CRP σχετίζεται με την εξαιρετικής ταχύτητας και εύρους αύξηση των συγκεντρώσεων πλάσματος. Αυτές αυξάνονται περισσότερο από 1000 φορές σε διάστημα 24-48 ώρες μετά από οξεία φλεγμονώδη διέγερση ή OEM και μειώνονται με χρόνο ημίσειας ζωής 24 ωρών μετά την απόσυρση της διέγερσης. Οι αλλαγές δε σχετίζονται με τοπικές ή συστηματικές αγγειακές ή φλεγμονώδεις επιδράσεις της CRP στους ασθενείς, αλλά μόνο με την οφειλόμενη στην παθολογία απάντηση οξείας φάσης. Το γεγονός αυτό

επιβεβαιώνεται από την πειραματική παρατήρηση ότι η έγχυση ακόμα και τεράστιων δόσεων ανθρώπινης CRP σε ζώα δε συνοδεύεται από φλεγμονώδεις διεργασίες.

### ***Η σύνθεση της CRP***

Η κυκλοφορούσα CRP παράγεται στα ηπατοκύτταρα. Υπάρχουν ενδείξεις εξωηπατικής σύνθεσης, οι οποίες δεν έχουν επιβεβαιωθεί, αν και θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν τις τοπικές επιδράσεις της CRP.<sup>209, 210</sup> Βέβαια, η συμβολή της τοπικά παραγόμενης CRP στις περιφερικές συγκεντρώσεις δεν μπορεί παρά να είναι ελάχιστη. Η ηπατική σύνθεση της CRP βρίσκεται υπό τον εξαιρετικά ευαίσθητο έλεγχο των προφλεγμονωδών κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένων της ιντερλευκίνης 1 και 6, και του TNF-α, έτσι ώστε κάθε μορφή ιστικής βλάβης, λοίμωξης, φλεγμονής, ή μη φυσιολογικού stress να σχετίζεται με αυξημένες συγκεντρώσεις κυκλοφορούσας CRP.<sup>211</sup> Η CRP απομακρύνεται από το πλάσμα και καταβολίζεται αποκλειστικά από τα ηπατοκύτταρα,<sup>212</sup> ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής στους ανθρώπους είναι 19 ώρες ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη νόσου ή από τις συγκεντρώσεις στο πλάσμα. Τελικά ο μόνος καθοριστής των συγκεντρώσεων της CRP στο πλάσμα είναι ο ρυθμός σύνθεσής της.<sup>213</sup>

Είναι σημαντικό κατά τη φάση κλινικής αξιολόγησης των τιμών της CRP να διαχωρίζεται η μικρή διακύμανση των βασικών τιμών της στην ηρεμία από τις τεράστιες αυξήσεις που οφείλονται σε οξέα ερεθίσματα, όπως η σήψη, το τραύμα, η ιστική νέκρωση, και που μπορεί να διατηρηθούν για μήνες ή και χρόνια σε άτομα με φλεγμονώδεις νόσους, όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, νόσος του Crohn, λέμφωμα κτλ. Η μη ειδική φύση της CRP δεν καθιστά ιατρικώς ορθή την αξιολόγηση ενός ασθενούς με βάση μόνο την τιμή της CRP, χωρίς προηγουμένως να έχει αναλυθεί το ιστορικό και η κλινική κατάσταση του ασθενούς.<sup>177</sup>

### ***CRP και Στεφανιαία Νόσος***

Ο χαρακτήρας του ρόλου της CRP στη ΣΝ είναι δύσκολο να εξακριβωθεί. Υπάρχουν δεδομένα από μελέτες παρατήρησης και τυχαιοποιημένες μελέτες που επιχείρησαν να διευκρινήσουν κατά πόσο η CRP αποτελεί παράγοντα κινδύνου, αιτιολογικό ή προγνωστικό παράγοντα.

*Ο ρόλος της CRP ως παράγοντα κινδύνου για ΣΝ:* Οι μελέτες παρατήρησης δίνουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τους πιθανούς παράγοντες κινδύνου για

ΣΝ. Το 1981 περίπου 200 παράγοντες και φαινότυποι σχετίστηκαν με τη ΣΝ σε μελέτες παρατήρησης.<sup>214</sup> Η λίστα αυτή σήμερα είναι μεγαλύτερη και αυξάνεται συνεχώς με την προσθήκη των γενετικών ευρημάτων.<sup>215</sup> Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν: α) συμπεριφορικούς, διαιτητικούς παράγοντες ή αφορούν τον τρόπο ζωής (κάπνισμα, διαιτητικό λίπος, φυσική δραστηριότητα), β) λοιμώξεις (εξωγενή έκθεση), γ) μεταβολές σε συστατικά του αίματος (ενδιάμεσοι φαινότυποι, βιοδείκτες), όπως τα λιπίδια και οι λιποπρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες φλεγμονής και πήξης, οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες, οι οξειδωτικοί δείκτες του στρες, δ) άλλους πιο περίπλοκους φαινοτύπους και διαταραχές, όπως τις ηλεκτροκαρδιογραφικές μεταβολές (διάστημα και διακύμανση QT) ε) την παχυσαρκία στ) την αρτηριακή πίεση (ΑΠ) και ζ) το σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ).<sup>216</sup> Παρόλη την εκτενή χρήση μοντέλων υπολογισμού του κινδύνου, πολλά καρδιαγγειακά συμβάματα επισυμβαίνουν σε άτομα με ενδιάμεσες τιμές των παραγόντων κινδύνου.<sup>217-219</sup> Το γεγονός αυτό καθιστά επιθυμητή την ανεύρεση νέων βιοδεικτών για τον υπολογισμό του κινδύνου, με τη CRP να τυγχάνει ιδιαίτερης προσοχής.

Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση προοπτικών μελετών συσχέτισης της hsCRP και της ΣΝ συμπεριέλαβε δεδομένα 22 μελετών και σύνολο 7068 συμβαμάτων με μέση περίοδο παρακολούθησης 12 έτη.<sup>220</sup> Η σύγκριση του κινδύνου για ΣΝ μεταξύ ατόμων με υψηλή hsCRP (ανώτερο τεταρτημόριο) και ατόμων με χαμηλή hsCRP (κατώτερο τεταρτημόριο), με τιμές 2.4mg/L και 1.0mg/L αντίστοιχα, ανέδειξε μια τιμή σχετικού κινδύνου για ΣΝ της τάξης του 1.58 [95% διάστημα εμπιστοσύνης (ΔΕ), 1.48-1.68]. Τα άτομα με υψηλές συγκεντρώσεις CRP έχουν επίσης αυξημένες τιμές περιφερικής και κεντρικής ΑΠ, ταχύτητας σφυγμικού κύματος, προαθηρωματικών λιποπρωτεϊνών (απολιποπρωτεΐνη Β) και δείκτη μάζας σώματος, έχουν υψηλότερη επίπτωση κοιλιακής παχυσαρκίας (λόγος περιμέτρου μέσης-γλουτών), διαβήτη ή μεταβολικού συνδρόμου, ιστορικού κατανάλωσης αλκοόλ, ιστορικού καπνίσματος και ιστορικού χαμηλού βάρους κατά τη γέννηση.<sup>221-229</sup> Αντίθετα, η συχνότητα των προφυλακτικών παραγόντων, όπως η φυσική δραστηριότητα, η HDL-χοληστερόλη, η απολιποπρωτεΐνη Α1 και η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει την τάση να είναι μικρότερη στους ασθενείς αυτούς.<sup>230</sup> Οι τιμές της CRP αυξάνονται με την ηλικία<sup>231</sup> και σχετίζονται και με κοινωνικοοικονομικά χαρακτηριστικά,<sup>221</sup> καθώς και με μια πληθώρα δεικτών αγγειακού κινδύνου (ινωδογόνο, αντιπυρονεκτίνη, αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 1, τριγλυκερίδια κ.α.).<sup>232-234</sup> Στη μελέτη National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) η υψηλή hsCRP συνδέεται με παθολογικά επίπεδα διάφορων παραγόντων (κάπνισμα, ολική χοληστερόλη, συγκεντρώσεις HDL-χοληστερόλης, τριγλυκερίδια, ΑΠ, γλυκόζη

νηστείας και δείκτης μάζας σώματος) στο 78% των ανδρών και το 67% των γυναικών.<sup>235</sup> Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση, η οποία συμπεριέλαβε και νέα δεδομένα από τη Northwick Park Heart II Study (NPHS-II) και την Edinburgh Artery Study (EAS), καθώς και δεδομένα από 31 μελέτες που περιελάμβαναν 84063 άτομα και 11252 νέες περιπτώσεις ΣΝ, έδειξε ότι η συσχέτιση CRP και ΣΝ είναι καθολικά αποδεικνυόμενη.<sup>236</sup>

Είναι αμφίβολο ποιοι από τους παραπάνω παράγοντες αποτελούν πραγματικούς συμπαράγοντες και ποιοι είναι μεσολαβητές της επίδρασης της CRP στον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Για παράδειγμα, οι υψηλές συγκεντρώσεις hsCRP σε μεσήλικες έχει βρεθεί ότι σχετίζεται ανεξάρτητα με την ανάπτυξη ΣΔ και υπέρτασης στη μετέπειτα περίοδο της ζωής.<sup>222, 237</sup> Είναι όμως συνήθης η διόρθωση των αποτελεσμάτων των μελετών ως προς την ύπαρξη ΣΔ και υπέρτασης. Αν η υποτιθέμενη επίδραση της CRP στη ΣΝ μεσολαβείται από το ΣΔ ή την υπέρταση, η διόρθωση των αποτελεσμάτων καθίσταται μια λανθασμένη επιλογή. Επιπλέον, παρόμοια δράση στα τελικά αποτελέσματα μπορεί να έχει η διόρθωση ως προς τις συγκεντρώσεις ινωδογόνου.<sup>221</sup> In vitro μελέτες έδειξαν ότι η CRP κατέχει προαθηρωματικές επιδράσεις μέσω ενεργοποίησης του ιστικού παράγοντα, ο οποίος ενεργοποιεί το σύστημα πήξης και τελικά το ινωδογόνο.<sup>238</sup> Συνεπώς, η διόρθωση ως προς το ινωδογόνο υποεκτιμά την πραγματική επίδραση της CRP στον καρδιαγγειακό κίνδυνο.

*Ο ρόλος της CRP ως αιτιολογικού παράγοντα ΣΝ:* Η αύξηση της LDL, μεταξύ άλλων παραγόντων, αποτελεί αναμφισβήτητο παράγοντα κινδύνου για ΣΝ και συνδέεται με αυτήν αιτιολογικά.<sup>239</sup> Καθώς οι στατίνες μειώνουν παράλληλα με την LDL και τη CRP, αυτό θεωρήθηκε ως στοιχείο υπέρ της πιθανής αιτιολογικής συσχέτισης της CRP με τη ΣΝ.<sup>240-243</sup>

Το OEM σχετίζεται άμεσα με την οξεία φλεγμονή γύρω από τη βλάβη<sup>173</sup> και το συμπλήρωμα συμβάλλει σημαντικά στο μέγεθος των OEM που προκαλούνται από πειραματική απολίνωση στεφανιαίων αρτηριών σε θηλαστικά.<sup>244</sup> Όλες οι ανθρώπινες εμφραγματικές βλάβες περιέχουν CRP και ενεργοποιημένο συμπλήρωμα μέσα και πέριξ της ισχαιμικής περιοχής.<sup>174, 245</sup> Ο πιθανός μηχανισμός της παθογενετικότητας της CRP μεσολαβείται από τη σύνδεσή της με μόρια που εκφράζονται σε νεκρά ή βλαμμένα κύτταρα, την επακόλουθη ενεργοποίηση του συμπληρώματος με την απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων και την οψωνοποίηση των κυττάρων που βρίσκονται μέσα ή γύρω από τη βλάβη, γεγονός που ευνοεί τη διήθηση από

φλεγμονώδη κύτταρα και επιπρόσθετη βλάβη. Το σύστημα του συμπληρώματος είναι επίσης σε θέση να προκαλέσει άμεση νέκρωση κυττάρων, που θα επιβίωναν και αυτό οδηγεί στη νέκρωση μεγαλύτερης επιφάνειας μυοκαρδίου από ότι η σχετιζόμενη με την ισχαιμία.

Τα ποντίκια αποτελούν άριστο πειραματικό μοντέλο για τον έλεγχο της παθογένειας της δράσης της CRP, καθώς η CRP που περιέχουν δεν ενεργοποιεί το συμπλήρωμα σε αντίθεση με την ανθρώπινη CRP που ενεργοποιεί το συμπλήρωμα τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ποντίκια.<sup>246</sup> Η επίδραση λοιπόν της ανθρώπινης CRP που εγχέεται στα ποντίκια αντιπροσωπεύει την αντίστοιχη επίδρασή της στον άνθρωπο. Έτσι η έγχυση CRP σε ποντίκια που έχουν υποστεί απολίνωση των στεφανιαίων ή βλάβη ισχαιμίας-επαναγγείωσης επιδεινώνει την καρδιακή λειτουργία και αυξάνει τη θνητότητα μέσω αύξησης της εμφραγματικής περιοχής.<sup>189</sup> Η επίδραση είναι ειδική για την ανθρώπινη CRP και απόλυτα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα, καθώς και τα δύο μόρια συναποθηκεύονται στην περιοχή της βλάβης.<sup>189</sup> Ανάλογη είναι και η επίδραση της CRP σε ποντίκια μετά από απολίνωση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας.<sup>247</sup> Οι δυσμενείς αυτές επιδράσεις της CRP στο OEM αναστέλλονται από τη χορήγηση ενός νέου ειδικού αναστολέα της CRP (1-6 δι-φωσφοχολιν-εξάνη).<sup>248</sup> Το φάρμακο αυτό δεν έχει από μόνο του καμία επίδραση στα ποντίκια παρά μόνο σε αυτά που έλαβαν ανθρώπινη CRP, άρα δεν είναι καρδιοπροστατευτικό per se αλλά μόνο μέσω της αναστολής της CRP.<sup>248</sup> Υπάρχουν σε εξέλιξη μελέτες για την αξιολόγηση της επίδρασης του αναστολέα αυτού στην επιβίωση ασθενών που έχουν υποστεί OEM.

*Ο ρόλος της CRP ως προγνωστικού παράγοντα σε ασθενείς με ΣΝ:* Μετά από OEM υπάρχει μια απάντηση οξείας φάσης με αύξηση των τιμών της CRP.<sup>249, 250</sup> Η συσχέτιση μεταξύ των επίμονα αυξημένων τιμών CRP μετά από OEM και της δυσμενούς πρόγνωσης αναφέρθηκε αρχικά το 1982<sup>251</sup> και ακολούθως πολλές μεγάλες μελέτες έδειξαν ότι η αυξημένη μέγιστη και μετεμφραγματική CRP σχετίζεται σημαντικά με αυξημένη επίπτωση καρδιακών επιπλοκών, όπως καρδιακή ανεπάρκεια και καρδιακός θάνατος, και μάλιστα ανεξάρτητα από άλλους προγνωστικούς παράγοντες.<sup>185, 252-258</sup>



### **Οι συγκεντρώσεις της CRP στο γενικό πληθυσμό**

Σε φυσιολογικούς ενήλικες η CRP βρίσκεται σε ίχνη στο πλάσμα. Σε μια μελέτη στη Μ. Βρετανία η διάμεση τιμή CRP σε 468 ενήλικες ήταν 0.8mg/L, η εννεηκοστή θέση 3mg/L και η εννεηκοστή ένατη 10mg/L.<sup>259</sup> Παρόμοιες είναι και οι συγκεντρώσεις σε πληθυσμούς από τις ΗΠΑ<sup>260</sup> και τη Βόρεια Ευρώπη,<sup>261</sup> Σε μη επιλεγμένους ασθενείς οι συγκεντρώσεις έχουν την τάση να αυξάνονται με την ηλικία. Η τυπικά κυρτωμένη καμπύλη της CRP ομοιάζει την κανονική κατανομή όταν λογαριθμούνται οι τιμές της. Στις ΗΠΑ το 50% του πληθυσμού έχει CRP>3mg/L και το 33% μεταξύ 3 και 10mg/L.<sup>260</sup> Σε σύγκριση με πληθυσμούς Βορειοευρωπαίων τα επίπεδα CRP των Αφροαμερικανών είναι υψηλότερα, ενώ των Ιαπώνων και των Κινέζων χαμηλότερα.<sup>262, 263</sup> Μάλιστα στους γηγενείς Ιάπωνες τα επίπεδα CRP είναι 10 φορές μικρότερα από τα αντίστοιχα των Ευρωπαίων,<sup>264</sup> χωρίς να είναι γνωστή η αιτία. Σε φυσιολογικούς ενήλικες όπου τα επίπεδα CRP παρακολούθηθηκαν ανά μήνα, η διακύμανση των τιμών ήταν μικρή και συνήθως εντός των ορίων 0.1-3mg/L, αλλά και με σπάνιες ακραίες μεταβολές μη σχετιζόμενες με κλινική παθολογία. Περίπου το 50% της διακύμανσης των τιμών της CRP καθορίζεται γενετικά και σχετίζεται με μη μεταφράσιμους πολυμορφισμούς του γονιδίου της CRP. Μια άλλη σημαντική παράμετρος που επιδρά στις τιμές της CRP είναι η παχυσαρκία και μάλιστα η κεντρικού τύπου,<sup>265</sup> κατά την οποία η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα μακροφάγα και τα λιποκύτταρα<sup>266</sup> και η πιθανή παραγωγή CRP από τα ίδια τα λιποκύτταρα,<sup>267</sup> αυξάνουν τις περιφερικές συγκεντρώσεις CRP. Η ετήσια διακύμανση της CRP σε πληθυσμούς υγιών ενηλίκων είναι παρόμοια με αυτή της αρτηριακής πίεσης, της χοληστερόλης του ορού ή άλλων κυκλοφορούντων δεικτών της φλεγμονής (ινωδογόνο, λευκά αιμοσφαίρια).<sup>268-270</sup> Ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ δυο τιμών CRP στο ίδιο άτομο σε χρονικό διάστημα λίγων ετών είναι 0.6.<sup>220</sup>

## **VI. Γενετικό υπόβαθρο στεφανιαίας νόσου**

### **Ανίχνευση «ένοχων» γονιδίων**

Η επιτυχία της γενετικής σε ότι αφορά τις μονογονιδιακές παθήσεις είναι αναμφισβήτητη. Έχει υπολογιστεί ότι υπάρχουν περισσότερες από 6000

μονογονιδιακές παθήσεις, στις οποίες >2000 «ένοχα» γονίδια έχουν αναγνωρισθεί.<sup>271</sup>  
<sup>272</sup> Σε αντίθεση με αυτές τις παθήσεις, στις οποίες η ύπαρξη του γονιδίου είναι απαραίτητη και αρκετή για την ανάπτυξη του φαινοτύπου, στις πολυγονιδιακές παθήσεις, δεν παίζει κυρίαρχο ρόλο κάποιο γονίδιο. Οι μονογονιδιακές παθήσεις είναι σχετικά σπάνιες, εμφανιζόμενες με επίπτωση που κυμαίνεται από 1 /1000 έως 1/10000, κυρίως λόγω της επίδρασης πάνω τους της φυσικής επιλογής. Σε αυτές τις παθήσεις ο ρόλος του γονιδίου είναι εξαιρετικά σημαντικός και η επίδρασή του προβλέψιμη είτε ακολουθεί υπολειπόμενη είτε επικρατούσα κληρονομικότητα.

Στις κοινές χρόνιες παθήσεις, όπως η ΣΝ, πολυάριθμα γονίδια συμβάλλουν στην εμφάνιση του φαινοτύπου, με καθένα από αυτά να παίζει έναν επιμέρους ρόλο. Για τη ΣΝ υπολογίζεται ότι ενέχονται διάφορα γονίδια, τα οποία συμβάλλουν σε ποσοστό 5-10% στην εμφάνιση του φαινοτύπου. Για τη χαρτογράφηση των χρωμοσωμικών θέσεων των γονιδίων αυτών, με δεδομένη μια απόσταση τουλάχιστον 6000bp μεταξύ τους, θα απαιτούνταν τουλάχιστον 500000 δείκτες DNA, σε αντίθεση με τους 300 που θα απαιτούνταν για την ανίχνευση γονιδίων μονογονιδιακών παθήσεων. Επιπλέον, στις μονογονιδιακές παθήσεις είναι δυνατό να γίνει συλλογή DNA από οικογένειες με σκοπό τη δημιουργία ενός γενεαλογικού δέντρου 2 ή 3 γενεών. Αν κάποιος παράγοντας κληρονομείται από τα προσβεβλημένα μέλη σε μεγαλύτερη συχνότητα από ότι είναι αναμενόμενο με βάση την τύχη, χαρακτηρίζεται ότι βρίσκεται σε γενετική σύνδεση (linkage), που σημαίνει ότι το γονίδιο που ευθύνεται για την ασθένεια είναι σε πολύ κοντινή θέση από τον δείκτη DNA. Αντίθετα η γενετική σύνδεση προσδίδει λιγότερη βοήθεια και ευαισθησία στη διερεύνηση πολυγονιδιακών παθήσεων. Η προτιμώμενη μέθοδος είναι η διενέργεια μελετών συσχέτισης, οι οποίες απαιτούν τη συμμετοχή μεγάλου αριθμού ατόμων που δε συνδέονται με συγγενικούς δεσμούς μεταξύ τους. Δύο είναι οι βασικές οδοί μελέτης, η άμεση (προσέγγιση ενός υποψήφιου γονιδίου) και η έμμεση (γενικές μελέτες γονιδιώματος).

Όποια και αν είναι η οδός, άμεση ή έμμεση, οι βασικές αρχές της μεθόδου παραμένουν οι ίδιες. Τα περισσότερα γονίδια έχουν διάφορες μορφές που χαρακτηρίζονται ως αλληλία. Η διαφορά μεταξύ των αλληλίων βρίσκεται στην αλληλουχία του DNA, όπου και διαφέρουν συνήθως σε 1 ή 2 νουκλεοτίδια. Τα αλληλία εντοπίζονται πάντα στην ίδια γονιδιακή θέση. Κάθε άτομο κληρονομεί δύο αλληλία (ένα από κάθε γονέα), τα οποία μπορεί να είναι ίδια (ομοζυγώτες) ή διαφορετικά (ετεροζυγώτες). Στις μελέτες συσχέτισης υπολογίζονται οι συχνότητες εμφάνισης των αλληλίων στον νοσούντα πληθυσμό και σε μία ομάδα ελέγχου που αποτελείται από υγιή άτομα. Κάθε αλληλίο το οποίο εμφανίζεται πιο συχνά στους

νοσούντες αποτελεί ένα αλληλίο αυξημένου κινδύνου, ενώ αν εμφανίζεται πιο συχνά στους υγιείς είναι προστατευτικός παράγοντας. Η άμεση οδός συνίσταται στην επιλογή ενός υποψήφιου γονιδίου, το οποίο μπορεί να ενέχεται στην εκδήλωση της μελετώμενης νόσου με βάση τη λειτουργία του, και στον υπολογισμό των συχνοτήτων των αλληλίων αυτού στον πληθυσμό των νοσούντων και των υγιών. Στην οδό της γενικής μελέτης του γονιδιώματος δεν υπάρχει προκαθορισμένη επιλογή γονιδίου με βάση την κρίση του ερευνητή. Αντίθετα, γίνεται καταγραφή του γονιδιώματος ασθενών και υγιών με εκατοντάδες χιλιάδες δείκτες, με σκοπό την ανίχνευση αυτών που εμφανίζονται συχνότερα στον πληθυσμό των ασθενών. Με τη μέθοδο αυτή προκύπτουν εκατοντάδες ψευδώς θετικά αποτελέσματα, τα οποία επαληθεύονται ή απορρίπτονται σε ανεξάρτητους πληθυσμούς μέσα από τη διενέργεια μελετών συσχέτισης.

### ***Το εγχείρημα του ανθρώπινου γονιδιώματος***

Μετά την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος,<sup>273</sup> και την ανάλυση του,<sup>274</sup> φάνηκε ότι το 99.5% των ανθρώπινου DNA είναι πανομοιότυπο. Οι παρατηρούμενες διαφορές είναι υπεύθυνες για την ανθρώπινη ποικιλότητα, σε ότι αφορά χαρακτηριστικά όπως το ύψος και το φύλο, αλλά και σε ότι αφορά την προδιάθεση για την ανάπτυξη νοσημάτων. Από τις διαφορές αυτές που αποτελούνται από 15 εκατομμύρια νουκλεοτίδια (0.5%), το μεγαλύτερο μέρος της ανθρώπινης φαινοτυπικής ποικιλότητας, συμπεριλαμβανομένης και της προδιάθεσης για τις ασθένειες, οφείλεται σε αντικατάσταση ενός κάθε φορά νουκλεοτιδίου, ενώ φαίνεται ότι κάθε άνθρωπος φέρει περίπου 3 εκατομμύρια τέτοιες αντικαταστάσεις. Αυτές οι μεταβολές στο γονιδιακό υπόστρωμα χαρακτηρίζονται ως μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP). Οι SNP κατανέμονται σε όλη την έκταση του ανθρώπινου γονιδιώματος (ένας SNP κάθε 1000 περίπου bp) και αποτελούν τους δείκτες των γενικών μελετών του γονιδιώματος. Με αυτόν τον τρόπο έχουν παραχθεί στο εμπόριο τσιπ που περιέχουν δείκτες για 500000 ή 1000000 SNP (απόσταση μεταξύ των θέσεων 6000 ή 3000 bp αντίστοιχα).

### ***Προβλήματα στην αναγνώριση του γενετικού υπόβαθρου της ΣΝ***

Υπάρχουν διάφορες δυσκολίες σε ότι αφορά την ανίχνευση των προδιαθεσικών γενετικών παραγόντων πολυπαραγοντικών παθήσεων, όπως η ΣΝ.

Οι δυσκολίες αυτές περιλαμβάνουν τη φαινοτυπική και τη γονοτυπική ετερογένεια, την αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδίων και μεταξύ γονιδίου και περιβάλλοντος και το γεγονός ότι η αιτιολογική βάση των ασθενειών μπορεί να οφείλεται σε κοινές γενετικές παραλλαγές με μικρή φαινοτυπική επίδραση ή σε σπάνια μεταβολές με μεγάλο αντίκτυπο στο φαινότυπο. Πιο αναλυτικά, σε ότι αφορά τη φαινοτυπική ετερογένεια, είναι γνωστό ότι η ΣΝ μπορεί να εκδηλωθεί με διάφορους κλινικούς φαινοτύπους, συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας σταθερής στηθάγχης, των οξέων στεφανιαίων επεισοδίων, το OEM, τον αιφνίδιο καρδιακό θάνατο και το ιστορικό στεφανιαίας επαναγγείωσης. Οι μετρήσεις του βαθμού της στεφανιαίας αθηρωμάτωσης, με μεθόδους όπως το ασβέστιο των στεφανιαίων αρτηριών ή η επεμβατική στεφανιαία αγγειογραφία, είναι υποκειμενικές και κατά βάση ποιοτικές, σε αντίθεση με το διχοτομικό χαρακτήρα της εμφάνισης καρδιαγγειακού επεισοδίου (ναι ή όχι). Η αθηρωμάτωση και το OEM αποτελούν διακριτούς φαινοτύπους, ωστόσο το δεύτερο σχετίζεται περισσότερο με την αστάθεια και τη ρήξη των αθηρωματικών πλακών παρά με την ποσότητα του αθηρωματικού φορτίου.

Η γενετική ετερογένεια είναι επίσης πιθανή με δεδομένες τις πολυάριθμες πιθανές αιτιολογικές οδούς πρόκλησης της ΣΝ. Για παράδειγμα η ελάττωση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης μπορεί να προέρχεται από την επίδραση μεταλλάξεων σε γονίδια διάφορων μεταβολικών οδών. Παρομοίως, η μετατροπή της σταθερής στεφανιαίας αθηρωματικής πλάκας σε ασταθή φλεγμαίνουσα πλάκα μπορεί να είναι το αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη διαδικασία και στην αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας.

Μία γενετική μετάλλαξη μπορεί να συμβάλλει μόνο κατά ένα μικρό ποσοστό (1-2%) στη συνολική γενετική επίδραση σε φαινοτύπους πολύπλοκων παθήσεων, όπως η ΣΝ, και η αναγνώριση ενός σχετικού κινδύνου που κυμαίνεται μεταξύ 1.1-1.5 είναι τυπική για την ανάδειξη της μελετώμενης μετάλλαξης ως παράγοντα προδιάθεσης για την ασθένεια.<sup>275</sup> Η αποκάλυψη αυτών των μικρών επιδράσεων απαιτεί την ανάλυση μεγάλων δειγμάτων πληθυσμού, γεγονός που οδήγησε στη δημιουργία βιοτραπεζών σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Ισλανδία, η Αγγλία και η Εσθονία.<sup>276</sup> Η αναγνώριση της αλληλεπίδρασης μεταξύ γονιδίων ή γονιδίου – περιβάλλοντος είναι σημαντική για την ανάδειξη γονιδίων υπεύθυνων για την εμφάνιση πολύπλοκων νοσημάτων, ωστόσο απαιτεί τη λήψη δειγμάτων μεγάλου μεγέθους.

Οι περισσότερες γενετικές επιδημιολογικές μελέτες σε πολύπλοκα νοσήματα όπως η ΣΝ θεωρούν ότι οι κοινές μεταλλάξεις (συχνότητα υπολειπόμενου αλληλίου

>5%) ενέχονται για το μεγαλύτερο ποσοστό της γενετικής προδιάθεσης για τη νόσο. Ωστόσο τόσο οι κοινές όσο και οι σπάνιες μεταλλάξεις μπορούν να έχουν παρόμοια επίδραση στον φαινότυπο. Για να αναγνωριστούν όμως οι υπεύθυνες σπάνιες μεταλλάξεις απαιτείται επανακωδικοποίηση ή χρήση μεγάλου μεγέθους δειγμάτων.

### ***Οι μέχρι σήμερα γνωστές συσχετίσεις της ΣΝ με γενετικούς παράγοντες***

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει γενετικό υπόστρωμα σχεδόν στο σύνολο των γνωστών ασθενειών. Στη μελέτη InterHeart το οικογενειακό ιστορικό ΣΝ σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για την πάθηση κατά 1.5 φορά (1.45 μετά από διόρθωση για άλλους παράγοντες κινδύνου).<sup>277</sup> Στη μελέτη Procam το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος παράγοντας για την ύπαρξη ΣΝ.<sup>278</sup> Επιπλέον στη μελέτη Framingham, η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού ΣΝ, ΑΕΕ ή περιφερικής αρτηριοπάθειας σχετίστηκε με αύξηση του κινδύνου για ΣΝ κατά 2.4 στους άνδρες και κατά 2.2 στις γυναίκες.<sup>1</sup> Διάφορες μελέτες επιβεβαίωσαν την αύξηση του κινδύνου για ΣΝ κατά 2 έως 3 φορές σε συγγενείς πρώτου βαθμού.<sup>279-281</sup> Το οικογενειακό ιστορικό ΣΝ σε έναν συγγενή πρώτου βαθμού πριν από την ηλικία των 50 ετών αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για OEM σε μικρή σχετικά ηλικία.<sup>282, 283</sup> Σε οικογένειες με επιβεβαιωμένη ύπαρξη ΣΝ πριν την ηλικία των 46, η κληρονομικότητα φαίνεται να κυμαίνεται από 92-100%, ενώ σε οικογένειες με πιο όψιμη έναρξη της νόσου η κληρονομικότητα ανέρχεται σε 15-30%.<sup>281</sup> Η βάση δεδομένων με 8000 διδύμους στη Δανία έδειξε αυξημένη επίπτωση της ΣΝ και του θανάτου στους μονοζυγωτικούς διδύμους συγκριτικά με τους διζυγωτικούς (44% έναντι 14%).<sup>284</sup>

*Διαταραχές που σχετίζονται με τη ΣΝ και κληρονομούνται με Μενδέλεια χαρακτηριστικά:* Οι διαταραχές που σχετίζονται με τη ΣΝ και κληρονομούνται σύμφωνα με τους Μενδέλειους κανόνες, όπως η οικογενής υπερχοληστερολαιμία, αποτελούν μονογονιδιακές μεταλλάξεις που κληρονομούνται με τον αυτοσωματικό, υπολειπόμενο ή σχετιζόμενο με το Χ-χρωμόσωμα χαρακτήρα. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις του γονιδίου του LDL υποδοχέα (LDLR), της περιοχής σύνδεσης της απολιποπρωτεΐνη Β (APOB) και της προ-πρωτεΐνης κονβερτάσης subtilisin/kexin τύπου 9 οδηγούν σε οικογενή υπερχοληστερολαιμία, η οποία κληρονομείται με αυτοσωματικό τρόπο. Η ανάλυση της παθοφυσιολογίας της νόσου και της λειτουργίας των γονιδίων σε τέτοιου τύπου Μενδέλειες διαταραχές μπορεί να αυξήσει

στην κατανόηση της αιτιολογίας πολύπλοκων ασθενειών.<sup>285</sup> Επιπλέον, κοινές μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται σε Μενδέλειες διαταραχές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της προδιάθεσης για την ασθένεια στο γενικό πληθυσμό. Ορισμένες Μενδέλειες διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΣΝ και έχουν αποκαλύψει νέους μηχανισμούς εμφάνισης αυτής. Η έρευνα της οικογενούς ομόζυγης υπερχοληστερολαιμίας, μιας σπάνιας διαταραχής, οδήγησε στην ανακάλυψη των οδών του μεταβολισμού της LDL και στη μετέπειτα παρασκευή των στατινών.<sup>286</sup> Υπάρχουν τρία σπάνια μεταλλαγμένα αλληλία σε ισάριθμα γονίδια που επηρεάζουν το μεταβολισμό της HDL χοληστερόλης [ABCA1 (ATP-binding cassette A1), APOA1 (απολιποπρωτεΐνη A1) και LCAT (λεκιθίνη-χοληστερόλη ακυλτρανσφεράση)] και σχετίζονται με σύνδρομα που χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα HDL, ενώ ανευρίσκονται και στο γενικό πληθυσμό σε άτομα με χαμηλά επίπεδα HDL.<sup>287, 288</sup>

*Μελέτες συσχέτισης με τη ΣΝ υποψήφιων με βάση την παθοφυσιολογία αυτής γονιδίων:* Διάφορες μελέτες συσχέτισης διενεργήθηκαν στη δεκαετία του 1990 και πολλές μεταλλάξεις γονιδίων αναδείχθηκαν ως δείκτες προδιάθεσης για την εμφάνιση φαινοτύπων της ΣΝ. Τα κυριότερα αποτελέσματα από μελέτες συσχέτισης γονιδίων με τη ΣΝ αναφέρονται στον **Πίνακα 4**. Στο πλαίσιο αυτών των μελετών κινείται και η παρούσα μελέτη, καθώς η επιλογή των υπό εξέταση πολυμορφισμών έγινε με βάση το παθοφυσιολογικό υπόβαθρο και το γεγονός ότι υπάρχουν ενδείξεις και σε ορισμένες περιπτώσεις αποδείξεις ότι το ΣΡΑΑ και το ΣΝΠ σχετίζονται άμεσα με την ενδοθηλιακή βλάβη των στεφανιαίων αγγείων που δίνει γένεση στη ΣΝ.

**Πίνακας 4. Σημαντικές μελέτες συσχέτισης της ΣΝ με γενετικούς πολυμορφισμούς γονιδίων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία αυτής**

Συγγραφέας	Είδος μελέτης	Αριθμός ασθενών/ υγείων	Κλινικό σύμβαμα	Γενετικοί πολυμορφισμοί	ΣΚ (95% ΔΕ)
Yamada, 2002	Συσχέτισης	2819/2242	OEM	Κονξίνη 37 C1019T PAI-1 4G-668/5G Στρομελυσίνη-1 5A-1171/6A	1.4 (1.1-1.6) 1.6 (1.2-2.1) 4.7 (2.0-12.2)
McCarthy, 2004	Συσχέτισης	325/418	OEM	THBS2 THBS4 PAI	0.38 (0.14-1.01) 2.22 (0.93-5.28) 2.35 (0.90-6.12)
Song, 2004	Μετα-ανάλυση	15492/32965	ΣΝ	Απολιποπρωτεΐνη Ε ε4	1.42 (1.26-1.61)
Ye, 2006	Μετα-ανάλυση	66155/91307	ΣΝ	Παράγοντας V G1691A Προθρομβίνη G20210A PAI-1 4G-668/5G	1.17 (1.08-1.28) 1.31 (1.12-1.52) 1.06 (1.02-1.10)
Zwicker, 2006	Συσχέτισης	1425/1425	OEM	THBS1 N700S	1.4 (1.1-1.8) (ετεροζυγώτες) 1.9 (1.1-3.3) (ομοζυγώτες)

ΣΚ: σχετικός κίνδυνος, ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης, PAI-1: αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, THBS: γονίδιο θρομβοσποντίνης

Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανεξάρτητη επιβεβαίωση των ευρημάτων αποτελεί σημαντική παράμετρο στις γενετικές μελέτες. Ωστόσο τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών συσχέτισης σπάνια έχουν αναπαραχθεί και αυτό οφείλεται σε διάφορους λόγους.<sup>289, 290</sup> Η δημοσιευμένη βιβλιογραφία για το γενετικό υπόβαθρο της στεφανιαίας νόσου βρίθκει από μικρές μελέτες, που περιλαμβάνουν λιγότερο από 500 άτομα σε κάθε ομάδα (ασθενείς και υγείς). Αυτές οι μελέτες συσχέτισης είναι ευάλωτες σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (τύπου 1 σφάλμα), λόγω κρυφής διαστρωμάτωσης του πληθυσμού και πολυπλοκότητας στη διενέργεια πολλαπλών συγκρίσεων μεταξύ των ομάδων. Άλλα μειονεκτήματα είναι η φτωχή ομογένεια του δείγματος των ασθενών με στεφανιαία νόσο και κυρίως η αβεβαιότητα της βασικής υπόθεσης ότι το παραγόμενο από το υπό μελέτη γονίδιο προϊόν σχετίζεται παθοφυσιολογικά με τη ΣΝ. Ωστόσο, υπάρχουν κάποια ευρήματα τα οποία έχουν αναπαραχθεί επαρκώς: το ε4 αλληλίο της απολιποπρωτεΐνης Ε έχει βρεθεί και από μία μετα-ανάλυση των προϋπαρχόντων μελετών ότι σχετίζεται με 1.4 αύξηση του σχετικού κινδύνου για ΣΝ.<sup>291</sup> Δυο ακόμα πολυμορφισμοί, ο G1691A του γονιδίου του παράγοντα V και ο G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης σχετίστηκαν με μέτρια αύξηση του κινδύνου για ΣΝ (ΣΚ=1.2-1.3) σε μια άλλη μεγάλη μεταανάλυση,<sup>292</sup> μια συσχέτιση που δεν επιβεβαιώθηκε σε απλές μελέτες με μεγάλα πληθυσμιακά δείγματα.<sup>293</sup> Μια λιγότερο ισχυρή συσχέτιση αναγνωρίστηκε για τον πολυμορφισμό 4G-668/5G στο γονίδιο του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου.<sup>292</sup>

Χάρη στην εξέλιξη που πραγματοποιήθηκε από το πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος, η διενέργεια μελετών συσχέτισης πέρασε σε μια καινούρια φάση, καθώς η χρήση των μικροσυστοιχιών γονιδίων (microarrays) επέτρεψε την ταυτόχρονη ανάλυση πολύ μεγαλύτερου αριθμού μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών.<sup>294-298</sup> Η μελέτη GENE-QUEST ήταν η πρώτη που χρησιμοποίησε αυτήν την τεχνολογία και ανέλυσε το γενετικό υλικό 398 ζευγαριών διδύμων με πρώιμη εμφάνιση ΣΝ και διερεύνησε τη σχέση της εμφάνισης της νόσου με 72 SNP από 62 προεπιλεγμένα γονίδια.<sup>299</sup> Αναδείχθηκε συσχέτιση με 3 μεταλλάξεις των γονιδίων της θρομβοσποντίνης (THBS1, THBS2 και THBS4), τα οποία κωδικοποιούν μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών που συμμετέχουν στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρου και θεμέλιας ουσίας και στην αγγειογένεση. Αργότερα έγινε μια προσπάθεια να επαναληφθούν τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης και διερευνήθηκαν 210 πολυμορφισμοί σε 111 γονίδια σε ασθενείς με πρώιμη εμφάνιση ΣΝ.<sup>300</sup> Επιβεβαιώθηκε η τάση συσχέτισης της νόσου με τις μεταλλάξεις των THBS2 και THBS4, καθώς και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Ωστόσο, δεν κατέστη δυνατή η επίτευξη στατιστικής σημαντικότητας



στη δεύτερη γενετική μελέτη. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο N700S πολυμορφισμός του THBS1 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για OEM τόσο στους ομοζυγώτες όσο και στους ετεροζυγώτες στο πλαίσιο μιας μεγάλης μελέτης συσχέτισης ασθενών που επιβίωσαν από OEM σε ηλικία μικρότερη των 45 ετών.<sup>301</sup>

Διενεργήθηκαν και άλλες μεγάλες μελέτες με microarrays, οι οποίες συσχέτισαν μονογονιδιακούς πολυμορφισμούς με τη ΣΝ. Οι Yamada και συν. χρησιμοποίησαν μια προσέγγιση δύο φάσεων για τη μελέτη μεταλλάξεων σε ασθενείς με ιστορικό OEM.<sup>302</sup> Αρχικά μέτρησαν τις συχνότητες 112 SNP από 71 υποψήφια γονίδια σε 909 ασθενείς και βρήκαν ότι 19 πολυμορφισμοί στους άνδρες και 18 στις γυναίκες εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση. Στη συνέχεια προσπάθησαν να αναπαράγουν τα αποτελέσματα αυτά σε μια άλλη ανεξάρτητη μελέτη σε Ιάπωνες ασθενείς με ιστορικό OEM και υγιείς ενήλικες.<sup>303</sup> Ο αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση OEM επιβεβαιώθηκε για τον C1019T πολυμορφισμό του γονιδίου της κονεξίνης 37 στους άνδρες, ενώ ο 4G-668/5G πολυμορφισμός του γονιδίου του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και ο 5A-1171/6A πολυμορφισμός του γονιδίου της στρωμελυσίνης. Στο σύνολο αυτές οι μελέτες, που βασίστηκαν σε πιο εξελιγμένες τεχνολογικά μεθόδους, προσέθεσαν πολύ λίγα στις προηγούμενες μελέτες σε ότι αφορά την ανάδειξη γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση ΣΝ, καθώς οι αρχικά σημαντικές συσχετίσεις δεν επιβεβαιώθηκαν από νεότερα αποτελέσματα.

*Μελέτες συνολικού γονιδιώματος και συσχέτιση με τη ΣΝ:* Τα τελευταία χρόνια η οδός του υποψήφιου γονιδίου τυγχάνει συνεχώς και λιγότερης προσοχής, καθώς μελέτες του συνολικού γονιδιώματος επιλέγονται όλο και πιο συχνά για την ανίχνευση πολυμορφισμών που σχετίζονται με τη ΣΝ. Οι δύο κυρίαρχες στρατηγικές αφορούν της μελέτες συσχέτισης σε οικογένειες και τις μελέτες του συνολικού γονιδιώματος σε άτομα που δεν έχουν συγγενικούς δεσμούς.

α) Μελέτες συσχέτισης σε οικογένειες: Οι μελέτες συσχέτισης σε οικογένειες, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες σε μη συγγενικό πληθυσμό, δεν εξαρτώνται από προϋπάρχουσες υποθέσεις που αφορούν το μηχανισμό επίδρασης του υποψήφιου γονιδίου στην υπό εξέταση πάθηση. Τα χαρακτηριστικά και τα αποτελέσματα των κυριότερων μελετών αυτής της κατηγορίας στη ΣΝ φαίνονται στον **πίνακα 5**. Η πρώτη από αυτές διενεργήθηκε σε Φιλανδούς ασθενείς και έδειξε ότι υπάρχει σύνδεση της πρώιμα εμφανιζόμενης ΣΝ με συγκεκριμένες θέσεις που επιδρούν στις παραγωγικές ιδιότητες (quantitative trait) στα χρωμοσώματα 2 και X.<sup>304</sup> Σε μια άλλη μελέτη σε οικογένειες με εμφάνιση πρώιμης ΣΝ στο νησί του Αγ. Μαυρικίου

αναδείχθηκε μια καινούρια θέση συσχέτισης στο χρωμόσωμα 16.<sup>305</sup> Με τη μελέτη μιας συγκεκριμένης οικογένειας, πολλά μέλη της οποίας εμφάνισαν πρώιμη ΣΝ, αναγνωρίστηκε μια ακόμα θέση στο χρωμόσωμα 15.<sup>306, 307</sup> Ένα γονίδιο που βρίσκεται σε αυτή την περιοχή και μπορεί να ενέχεται στη συσχέτιση αυτή είναι το γονίδιο του ευοδωτικού παράγοντα των μυοκυττάρων 2 (MEF2), ενός μεταφραστικού παράγοντα που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών. Οι Helgadottir και συν. χρησιμοποίησαν 1068 μικροδορυφορικούς δείκτες και βρήκαν μια θέση συσχέτισης στο χρωμόσωμα 13 σε πληθυσμό Ισλανδών με οικογενειακό ιστορικό OEM.<sup>308</sup> Στη συνέχεια μελετήθηκαν 120 ακόμα μικροδορυφορικοί δείκτες σε άλλο πληθυσμό της ίδιας περιοχής που περιελάμβανε ασθενείς με OEM και υγιείς ενήλικες. Βρέθηκε ένας απλότυπος τεσσάρων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στο γονίδιο ALOX5AP (κωδικοποίηση της FLAP πρωτεΐνης-ενεργοποιητή της 5-λιποξυγενάσης που εμπλέκεται στην οδό παραγωγής του λευκοτριενίου B4), ο οποίος σχετίστηκε με διπλασιασμό του κινδύνου για OEM. Μια μελέτη που ακολούθησε επιβεβαίωσε αυτή τη συσχέτιση σε πληθυσμό με ΣΝ στην Αγγλία, και σε πληθυσμούς με ΑΕΕ στην Ισλανδία και τη Σκωτία.<sup>309</sup>

Με τη χρήση της ίδιας προσέγγισης αναγνωρίστηκε και άλλο ένα γονίδιο (LTA4H), που κωδικοποιεί την υδρολάση του A4 λευκοτριενίου και εμπλέκεται στον ίδιο φλεγμονώδη μηχανισμό.<sup>310</sup> Η μεγαλύτερη μελέτη αυτής της κατηγορίας ήταν η British Heart Foundation Family Heart Study, η οποία συμπεριέλαβε 1933 οικογένειες με τουλάχιστον 2 μέλη τους να έχουν υποστεί OEM σε νέα ηλικία.<sup>311</sup> Παρόλο το μεγάλο μέγεθος του δείγματος, δεν προέκυψε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση για κανένα από τους καρδιαγγειακούς φαινοτύπους που μελετήθηκαν (ο μεγαλύτερος σχετικός κίνδυνος που προέκυψε ήταν 1.15). Άλλες μελέτες βρήκαν ενδείξεις συσχέτισης των φαινοτύπων της ΣΝ με θέσεις των χρωμοσωμάτων 2,3,14,17, χωρίς όμως να αναγνωριστούν τα υποψήφια «ένοχα» γονίδια.<sup>312-315</sup>

Τελικά, από τις μελέτες συσχέτισης σε οικογένειες προέκυψαν αρκετές θέσεις διάφορων χρωμοσωμάτων που συνδέθηκαν με τη ΣΝ, χωρίς όμως η σύνδεση αυτή να αναπαραχθεί σε νέες μελέτες. Μόνο τρία γονίδια αναγνωρίστηκαν ότι σχετίζονται με τη ΣΝ (MEF2, ALOX5AP, LTA4H), γεγονός που αποδεικνύει τη δυσκολία που υπάρχει στη διενέργεια και αποκωδικοποίηση των αποτελεσμάτων τέτοιου είδους μελετών. Είναι χαρακτηριστικό ότι καμία από αυτές τις μελέτες δεν ανέδειξε σύνδεση της νόσου με το χρωμόσωμα 9, το οποίο όπως θα δούμε παρακάτω αναδείχθηκε σε μελέτες συνολικού γονιδιώματος ως ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ΣΝ.

**Πίνακας 5. Μελέτες συνολικού γονιδιώματος σε οικογένειες και συσχέτιση με τη ΣΝ**

Συγγραφέας	Χώρα	Πληθυσμός μελέτης οικογένειες (άτομα)	Κλινικό σύμβαμα	Χρωμοσωμική περιοχή	LOD score	Υπεύθυνο γονίδιο
Rajukanta, 2000	Φιλανδία	156 (364)	Πρώιμη ΣΝ	2q21-22 Xq23-26	3.7 3.5	-
Francke, 2001	Αγ. Μαυρίκιος	99 (535)	ΣΝ	16p13	3.06	-
Broeckel, 2002	Γερμανία	513 (1406)	Πρώιμη ΣΝ	14	3.9	-
Harrap, 2002	Αυστραλία	61 (161)	ΣΝ	2q36	2.6	-
Wang, 2003	ΗΠΑ	1 (25)	ΣΝ ή OEM	15q26	4.19	MEF2
Helgadottir, 2004	Ισλανδία	296 (2454)	OEM	13q12-13	2.86	ALOX5AP
Hauser, 2004	Ευρώπη/ΗΠΑ	438 (1168)	Πρώιμη ΣΝ	3q13	3.3	-
Samani, 2005	Μ. Βρετανία	1933 (4175)	ΣΝ ή OEM	2q14-21	1.15	-
Helgadottir, 2004	Ισλανδία	296 (2454)	OEM	12q22	-	LTA4H
Farrall, 2006	Ευρώπη	2036 (2658)	ΣΝ ή OEM	17q21	2.68	-

LOD score: λογάριθμος κλάσματος πιθανοτήτων σε ότι αφορά τη σύνδεση της γενετικής θέσης με τη ΣΝ

β) Μελέτες συσχέτισης συνολικού γονιδιώματος: Οι μελέτες ανάλυσης του συνολικού γονιδιώματος έγιναν πραγματοποιήσιμες μετά τη δημοσίευση του Διεθνούς Χάρτη Απλοτύπων, που έδωσε τη δυνατότητα αναγνώρισης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που σχετίζονται με πολύπλοκες ασθένειες με τη χρήση προτύπων γενετικών μεταλλάξεων.<sup>316, 317</sup> Οι μελέτες αυτές βασίζονται σε σάρωση όλου του γονιδιώματος χωρίς προαποφασισμένα προς μελέτη γονίδια και παθοφυσιολογικές υποθέσεις. Οι κυριότερες μελέτες συνολικού γονιδιώματος και κάποιες μελέτες επικύρωσης των αποτελεσμάτων τους φαίνονται στον **πίνακα 6**.

Η πρώτη από αυτές τις μελέτες έγινε το 2002 με σάρωση 65671 μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε 94 ασθενείς με OEM και 658 υγιείς από την Ιαπωνία.<sup>318</sup> Αναγνωρίστηκε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του OEM και δυο SNP του γονιδίου της λεμφοτοξίνης-α (LTA), που κωδικοποιούν ένα μέλος της οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων, η οποία εμπλέκεται στην αθηρωμάτωση σε μοντέλα ζώων.<sup>319</sup> Η συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου της LTA και του OEM επιβεβαιώθηκε από μια μελέτη συσχέτισης, η οποία ανέδειξε τη σημαντική συσχέτιση της νόσου με ένα πολυμορφισμό του LGALS2, ενός ρυθμιστικού της LTA γονιδίου.<sup>320</sup> Σε μια άλλη μελέτη γονιδιώματος με σάρωση 11053 SNP σε 6891 γονίδια προέκυψαν 9 μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίστηκαν με το OEM και οι συσχετίσεις αυτές αναπαράχθηκαν σε ακόλουθες μελέτες.<sup>321-324</sup> Επιπλέον, σε μια προοπτική πληθυσμιακή μελέτη σε Αμερικανούς άνδρες και γυναίκες ηλικίας >65 ετών επιχειρήθηκε η επιβεβαίωση των 9 παραπάνω συσχετίσεων μαζί με 65 επιπρόσθετους SNP που αναγνωρίστηκαν σε παλιότερες μελέτες.<sup>325</sup> Τουλάχιστον 4 πολυμορφισμοί που εμφανίστηκαν στους νέους απομονώθηκαν πιο συχνά και στους ηλικιωμένους ασθενείς με ΣΝ: KIF6 (μέλος της υπεροικογένειας των κινεσινών), LPA (συσχέτιση με αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης Α), TAS2R50 (γονίδιο του υποδοχέα της πικρής γεύσης) και VAMP8 (γονίδιο που σχετίζεται με την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων). Γενικά, οι πρώτες αυτές μελέτες συνολικού γονιδιώματος είχαν περιορισμένη ισχύ και ελλιπή κάλυψη του γονιδιώματος, γεγονός που οδήγησε στην αποκάλυψη μικρού αριθμού γενετικών μεταλλάξεων που σχετίζονται με τη ΣΝ.

Πρόσφατα η εξέλιξη της τεχνολογίας και της στατιστικής επέτρεψε τη διενέργεια υψηλότερης ισχύος μελετών συνολικού γονιδιώματος, δίνοντας σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το χρωμόσωμα 9, οι οποίες επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια επανειλημμένα.

**Πίνακας 6. Κυριότερες μελέτες συνολικού γονιδιώματος και συσχέτιση με τη ΣΝ**

Συγγραφέας	Χώρα	Αριθμός ασθενών/ υγείων	Κλινικό σύμβαμα	Γονίδια-Γενετικοί τόποι	ΣΚ (95% ΔΕ)
Ozaki, 2004	Ιαπωνία	1133/1006	OEM	LTA	1.78 (1.39-2.27)
Shiffman, 2005	ΗΠΑ	1345/1843	OEM	Palladin	1.40 (-)
				ROS1	1.75 (-)
				TAS2R50	1.58 (-)
				OR13G1	1.40 (-)
Iakoubova, 2006*	Ευρώπη, ΗΠΑ	2903/1080	OEM	FCAR	1.68 (1.10-2.57)
Shiffman, 2006*	ΗΠΑ	1200/262	OEM	VAMP8	1.75 (1.17-2.62)
				HNRPULI	1.92 (1.28-2.86)
Helgadottir, 2007	Ευρώπη	4587/12767	OEM	9p21	2.02 (1.72-2.36)
McPherson, 2007	Ευρώπη	2326/10427	ΣΝ	9p21	1.20 (1.02-1.42)
WTCCC, 2007	Ευρώπη	2000/3000	ΣΝ	9p21	1.37 (1.26-1.48)
Samani, 2007	Ευρώπη	2801/4582	ΣΝ	9p21	1.33 (1.18-1.51)
				6q25	1.24 (1.09-1.41)
				2q36	1.20 (1.06-1.35)
Larson, 2007	ΗΠΑ	1345	KAN	9p21	2.11 (-)
Luke, 2007*	ΗΠΑ	1806/1274	ΣΝ	LPA	3.14 (1.51-6.56)
Iakoubova, 2008*	Ευρώπη, ΗΠΑ	3394/1080	OEM, ΣΝ	KIF6	1.50 (1.05-2.15)
Shiffman, 2008*	ΗΠΑ	4522	OEM	KIF6	1.29 (1.10-1.52)
				VAMP8	1.20 (1.02-1.41)
				TAS20R50	1.13 (1.00-1.27)
				LPA	1.62 (1.09-2.42)

ΣΚ: σχετικός κίνδυνος, ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης, KAN: καρδιαγγειακή νόσος, \*: μελέτες επαλήθευσης των μελετών συνολικού γονιδιώματος:

Τέσσερις διακριτές, αλλά ισχυρά συνδεδεμένες μεταλλάξεις, που εντοπίστηκαν στην ίδια περιοχή του χρωμοσώματος 9, σχετίστηκαν με τη ΣΝ (rs2383206 και rs10757278) ή το OEM (rs2383207 και rs10757278) σε διαφορετικούς πληθυσμούς λευκών.<sup>298, 326, 327</sup> Οι McPherson και συν. σάρωσαν 100000 πολυμορφισμούς σε όλο το γονιδίωμα και βρήκαν ότι δυο SNP (rs10757274 και rs2383206), που εντοπίζονται σε απόσταση 20kb μεταξύ τους στο χρωμόσωμα 9, σχετίζονται με τη ΣΝ σε πληθυσμό από τον Καναδά,<sup>328</sup> αλλά όπως φάνηκε και σε άλλες 5 μελέτες σε πληθυσμούς λευκών της Δανίας και της Αμερικής. Οι Helgadottir και συν. σάρωσαν 305953 SNP και περιέγραψαν τη συσχέτιση μεταξύ OEM και 2 πολυμορφισμών του χρωμοσώματος 9 (rs2383207 και rs10757278) σε Ισλανδούς,<sup>326</sup> γεγονός που επιβεβαιώθηκε και σε 4 ακόμα Αμερικάνικες μελέτες. Η ίδια περιοχή του χρωμοσώματος 9 αναγνωρίστηκε και σε μελέτες γονιδιώματος της Μεγάλης Βρετανίας και της Γερμανίας.<sup>298, 327</sup> Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώθηκε και σε μια μικρή μελέτη ασθενών και υγείων στην Ιταλία, στο πλαίσιο της Framingham μελέτης και στην PROCARDIS μελέτη (4251 ασθενείς με ΣΝ και 4443 υγιείς από 4 Ευρωπαϊκές χώρες).<sup>329-331</sup> Όλα τα παραπάνω ανέδειξαν την περιοχή αυτή του χρωμοσώματος 9 ως την πιο τεκμηριωμένη περιοχή συσχέτισης με τη ΣΝ. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και σε πληθυσμούς μη λευκών, όπως πχ οι Νοτιοκορεάτες, οι Ιάπωνες και οι Κινέζοι.<sup>332-334</sup> Μόνο στους Αφροαμερικανούς φαίνεται να μην εμφανίζεται παρόμοια συσχέτιση.<sup>328</sup>

Η συσχέτιση των πολυμορφισμών του χρωμοσώματος 9 με τη ΣΝ εμφανίζεται εντυπωσιακά καθολική και ανεξάρτητη από άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως η ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης. Πραγματοποιούνται έρευνες για την ανίχνευση των γονιδίων που βρίσκονται σε στενή επαφή με τον παραπάνω γενετικό τόπο (9p21) και που προφανώς εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΣΝ. Είναι γνωστό ότι το χρωμόσωμα 9p21 περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν δύο εξαρτώμενους από την κυκλίνη αναστολείς των κινασών, τον CCDC22 και τον CDKN2B, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση των κυττάρων, στην ωρίμανση και στην απόπτωση. Οι περιοχές του χρωμοσώματος 9 που ορίζονται από το rs10811661 σχετίζονται επίσης με αυξημένη προδιάθεση για σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2,<sup>298</sup> ενώ αυτές που ορίζονται από το rs10811661 με άλλες αρτηριακές παθήσεις, όπως τα κοιλιακά, αορτικά και ενδοκράνια ανευρύσματα,<sup>335</sup> γεγονός που δείχνει ότι η σημασία της περιοχής αυτής δεν περιορίζεται μόνο στο πλαίσιο της ΣΝ. Πρέπει να αναφερθεί ότι η μετάλλαξη στο 9p21 είναι εξαιρετικά συχνή με το 75% των Καυκάσιων να φέρουν ένα ή περισσότερα αλληλία κινδύνου. Η περιοχή είναι ετερόζυγη στο 50% των Καυκασίων και ομόζυγη

στο 25% αυτών και σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου κατά 15-20% και 30-40% αντίστοιχα.

**ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## I. Εισαγωγή

Η στεφανιαία νόσος (ΣΝ) αποτελεί μια πολυπαραγοντική ασθένεια, η οποία ενέχεται αιτιολογικά σε μεγάλο βαθμό στη νοσηρότητα και τη θνητότητα της Καυκάσιας φυλής. Έχουν αναγνωριστεί πολλοί παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την επίπτωσή της, οι οποίοι ωστόσο παρουσιάζουν ποικίλη φαινοτυπική διεισδυτικότητα, οδηγώντας σε ένα φάσμα κλινικής συμπτωματολογίας. Έτσι, η ΣΝ μπορεί να διαδράμει ασυμπτωματικά ή και να εμφανιστεί αιφνίδια υπό τη μορφή οξέων στεφανιαίων επεισοδίων. Τα γονίδια που προδιαθέτουν για την εμφάνιση ΣΝ γενικά είναι άγνωστα. Δύο μεγάλης σημασίας ορμονικά συστήματα, το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (ΣΡΑΑ) και το σύστημα των νατριουρητικών πεπτιδίων (ΣΝΠ), αποτελούν σημαντικότερους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της καρδιαγγειακής φυσιολογίας και ομοιοστασίας. Η ενεργοποίηση του ΣΡΑΑ προκαλεί συστηματικές επιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την αγγειοσύσπαση και την αρτηριακή υπέρταση, ενώ η χρήση των αναστολέων του συστήματος αυτού έχει επιβεβαιωθεί ότι μειώνει τον κίνδυνο για την εμφάνιση οξέων στεφανιαίων επεισοδίων.<sup>336-338</sup> Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ΜΕΑ-ΑCΕ), ένας σημαντικός παράγοντας του ΣΡΑΑ, επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΝ μέσω της αύξησης των επιπέδων αγγειοτενσίνης II και της ελάττωσης των συγκεντρώσεων βραδυκινίνης,<sup>339, 340</sup> ώστε τελικά να παρατηρείται αυξημένη υπερπλασία και υπερτροφία των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων,<sup>341</sup> συσσώρευση κυκλοφορούντων μονοκυττάρων στο μέσο χιτώνα των αγγείων<sup>84</sup> και αυξημένη έκφραση του προερχόμενου από τα αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα.<sup>342</sup> Το ΣΝΠ συμμετέχει στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, την ομοιοστασία των υγρών του οργανισμού και την αναδιαμόρφωση των αγγείων.<sup>343-345</sup> Έχει βρεθεί ότι συστατικά του ΣΝΠ συμβάλλουν στη ρύθμιση της στεφανιαίας κυκλοφορίας και αποτελούν προστατευτικό μηχανισμό έναντι της ισχαιμικής βλάβης, καθώς μειώνουν την εμφραγματική περιοχή.<sup>346</sup> Από τα παραπάνω προκύπτει ότι γονίδια που πιθανόν σχετίζονται και επηρεάζουν την ενεργοποίηση των ΣΡΑΑ και ΣΝΠ είναι υποψήφια για να σχετίζονται με κάποιο τρόπο και με την επίπτωση και τη βαρύτητα της στεφανιαίας νόσου.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανούς συσχέτισης μεταξύ τριών γενετικών πολυμορφισμών του ΣΡΑΑ και ενός του ΣΝΠ και της ΣΝ σε ασθενείς με ιστορικό πρόσφατου οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (ΟΕΜ), που υποβλήθηκαν σε στεφανιαία αγγειογραφία στην Καρδιολογική Κλινική

του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Επίσης, διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών αυτών με τις συγκεντρώσεις hCRP, ενός φλεγμονώδους δείκτη αθηρωμάτωσης. Οι υπό εξέταση πολυμορφισμοί ήταν: ο πολυμορφισμός επανάληψης (CA)<sub>n</sub> του γονιδίου του αγγειοτενσινογόνου (AGT), ο πολυμορφισμός εισαγωγής/έλλειψης 250 bp του γονιδίου του ACE, ο πολυμορφισμός τετρανουκλεοτιδικής επανάληψης (TCTG)<sub>n</sub> του γονιδίου της ρενίνης (REN) και ο πολυμορφισμός επανάληψης (CT)<sub>n</sub> του γονιδίου του υποδοχέα A των νατριουρητικών πεπτιδίων (NPRA).

## II. Υλικό και μέθοδοι

### *Ο πληθυσμός της μελέτης*

Η παρούσα μελέτη διενεργήθηκε μεταξύ Μαρτίου του 2005 και Δεκεμβρίου του 2008. Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από δύο ομάδες, την ομάδα της ΣΝ με ασθενείς που είχαν πρόσφατο ιστορικό OEM και την ομάδα ελέγχου, στην οποία συμπεριλαμβάνονταν υγιείς ενήλικες Ελληνικής καταγωγής χωρίς ιστορικό μειζόνων νοσημάτων, χωρίς ύποπτη για καρδιαγγειακό νόσημα συμπτωματολογία ή ιστορικό συστηματικής λήψης φαρμακευτικών σκευασμάτων. Η περίοδος εισαγωγής των ασθενών στη μελέτη διήρκεσε από το Μάρτιο του 2005 έως τον Οκτώβριο του 2007, όταν και είχαν συμπληρωθεί οι αρχικοί στόχοι των 170 ασθενών για την κάθε ομάδα. Παράλληλα με το αρχικό αυτό χρονικό διάστημα, καθώς και μετά από αυτό πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία των δειγμάτων του αίματος των συμμετεχόντων [απομόνωση του DNA, εκλεκτική ενίσχυση των αλληλουχιών που περιείχαν τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς, ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, αποστολή δειγμάτων DNA σε ειδικό κέντρο για ανίχνευση της αλληλουχίας (sequencing) και καταγραφή των αποτελεσμάτων]. Το τελευταίο έτος πραγματοποιήθηκε η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, η συγγραφή ξενόγλωσσου άρθρου και η αποστολή του προς δημοσίευση σε διεθνές περιοδικό, καθώς και η συγγραφή του παρόντος κειμένου. Κατά την παραπάνω χρονική περίοδο ορισμένα δεδομένα της μελέτης τροποποιήθηκαν ένεκα των προκαταρτικών αποτελεσμάτων από την επεξεργασία των πρώτων χρονικά δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε αδυναμία ανάλυσης των αποτελεσμάτων που αφορούσαν τον πολυμορφισμό

έλλειψης 8bp του γονιδίου του NPRA, το οποίο αρχικά είχε σχεδιαστεί να συμπεριληφθεί στη μελέτη, γεγονός που αποδόθηκε στην πιθανή ασυμβατότητα μεταξύ των συνθηκών εκλεκτικής ενίσχυσης των 4 γονιδίων που συμπεριελήφθησαν στη μικτή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Ως εκ τούτου η μελέτη συνεχίστηκε λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα αποτελέσματα των 4 πολυμορφισμών [AGT (CA)<sub>n</sub>, ACE I/D, REN (TCTG)<sub>n</sub>, NPRA (CT)<sub>n</sub>] αντί των 5 αρχικώς προγραμματισμένων. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίστηκαν αμφίβολα αποτελέσματα κατά την ανάγνωση του sequencing ή της ηλεκτροφόρησης του DNA. Κατόπιν αυτού κρίθηκε απαραίτητος ο αποκλεισμός των αντίστοιχων συμμετεχόντων από την τελική επεξεργασία. Έτσι, από τον αρχικά σχεδιαζόμενο πληθυσμό αναλύθηκαν τα αποτελέσματα 158 ασθενών (ομάδα ΣΝ) και 144 υγιών συμμετεχόντων (ομάδα ελέγχου).

Η ομάδα της ΣΝ αποτελούνταν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διαδερμική στεφανιαία αγγειογραφία στο αιμοδυναμικό τμήμα της Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Ως ένδειξη της στεφανιαίας αγγειογραφίας ήταν το πρόσφατο (<1 μήνα) ιστορικό OEM. Το ιστορικό OEM ορίστηκε ως η παρουσία επίσημων ιατρικών εγγράφων που να βεβαιώνουν το OEM ως διάγνωση εξόδου από το νοσοκομείο ή η αντίστοιχη δήλωση από την πλευρά του ασθενούς και η παρουσία σημαντικών κυμάτων Q σε 2 τουλάχιστον συνεχείς απαγωγές στο ηλεκτροκαρδιογράφημα. Στη μελέτη δε συμπεριελήφθησαν οι ασθενείς που ικανοποιούσαν τα ακόλουθα κριτήρια αποκλεισμού: α) ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, β) ασθενείς με σοβαρού βαθμού βαλβιδοπάθεια, γ) με ιστορικό μη ισχαιμικής καρδιομυοπάθειας, δ) με ιστορικό στεφανιαίας επαναγγείωσης, ε) με ιστορικό μεταμόσχευσης οργάνων, στ) διαβητικοί ασθενείς ζ) ασθενείς με εμπύρετο ή άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα ενδεικτικά λοίμωξης.

Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από υγιείς ενήλικες, που επισκέπτονταν την Καρδιολογική Κλινική ή τα Εξωτερικά Ιατρεία, ιατρούς και άλλα μέλη του προσωπικού του νοσοκομείου. Απαραίτητη προϋπόθεση για την είσοδο στη μελέτη ήταν η απουσία σημείων και συμπτωμάτων καρδιαγγειακής νόσου και η απουσία συγγενικής εξ αίματος σχέσης με τους ασθενείς της μελέτης. Οι συμμετέχοντες στην ομάδα ελέγχου δεν έπασχαν από καμία χρόνια νόσο, δεν ελάμβαναν χρόνια φαρμακευτική αγωγή και δεν εμφάνισαν πρόσφατα εμπύρετο ή άλλα συμπτώματα ενδεικτικά λοίμωξης.

Όλοι οι συμμετέχοντες της μελέτης ήταν Ελληνικής καταγωγής, διέμεναν στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας, και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για την αιμοληψία, την απάντηση στο ερωτηματολόγιο της μελέτης και την αναφορά πληροφοριών σχετικά με τη χρήση φαρμάκων, τις χρόνιες παθήσεις και το οικογενειακό ιστορικό. Η μελέτη ήταν σε συμφωνία με τον ιατρικό κώδικα περί ηθικής των κλινικών μελετών.

### ***Κλινικοεργαστηριακός έλεγχος***

Κατά την αρχική εκτίμηση των ασθενών έγινε πλήρης καταγραφή του ατομικού και οικογενειακού ιστορικού, των έξεων και των συνηθειών διαβίωσης. Έγιναν σωματομετρικές μετρήσεις και καταγραφή του ύψους και του βάρους των συμμετεχόντων. Σε όλους τους συμμετέχοντες έγινε μέτρηση της αρτηριακής πίεσης και καταγραφή της καρδιακής συχνότητας. Από τα παραπάνω υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (BMI). Ως ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης θεωρήθηκε η καταγραφή συστολικής αρτηριακής πίεσης (SBP)  $\geq 140$  mm Hg ή διαστολικής αρτηριακής πίεσης (DBP)  $\geq 90$  mm Hg ή η λήψη αντιυπερτασικών φαρμάκων. Ως ιστορικό υπερλιπιδαιμίας ορίστηκε η επιβεβαιωμένη συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης  $>240$  mg/dL ή τριγλυκεριδίων  $>250$  mg/dL ή η λήψη υπολιπιδαιμικής αγωγής. Από όλους τους συμμετέχοντες ελήφθησαν περίπου 20ml περιφερικού αίματος υπό άσηπτες συνθήκες. Εστάλη δείγμα για διενέργεια γενικής αίματος και βιοχημικών εργαστηριακών εξετάσεων, ενώ κρατήθηκε δείγμα αίματος για τον υπολογισμό της υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP) και 4ml αίματος σε 2 φιαλίδια με αντιπηκτικό ( $K_3EDTA$ ) για την απομόνωση του DNA. Τα φιαλίδια για την απομόνωση του DNA διατηρήθηκαν στους  $-20^{\circ}C$  μέχρι την επεξεργασία τους. Η λήψη του αίματος από τους ασθενείς της ομάδας της ΣΝ έγινε κατά τις τελευταίες ημέρες νοσηλείας τους στην Καρδιολογική Κλινική (μέσο χρονικό διάστημα μετά το OEM:  $6.3 \pm 1.1$  ημέρες), ώστε οι τιμές της hsCRP να τείνουν προς τις τιμές ηρεμίας (τιμές προ του καρδιαγγειακού συμβάντος).

### ***Μέτρηση υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP)***

Ως μονάδα μέτρησης της φλεγμονώδους αντίδρασης των συμμετεχόντων στη μελέτη επιλέχθηκε ο προσδιορισμός της CRP. Η CRP αποτελεί ευρέως αναγνωρισμένο δείκτη φλεγμονής, αλλά και μέτρο αξιολόγησης των φλεγμονωδών διεργασιών που πραγματοποιούνται στο ενδοθήλιο των αγγείων ατόμων που

πάσχουν από αθηρωματική νόσο. Μάλιστα, η μέτρηση της hsCRP μπορεί να καταγράψει το βαθμό του καρδιαγγειακού κινδύνου, καθότι ανιχνεύει πολύ χαμηλά επίπεδα του μορίου. Στο πλαίσιο αυτό σε όλους τους ασθενείς της μελέτης έγινε υπολογισμός της hsCRP με ανοσονεφελομετρική μεθοδο. Οι τιμές αναφοράς του εργαστηρίου (Ανοσολογικό Τμήμα Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας) καταγράφονται στον **πίνακα 7**.

**Πίνακας 7. Τιμές αναφοράς του Ανοσολογικού Εργαστηρίου για τη μέτρηση της hsCRP (mg/dL)**

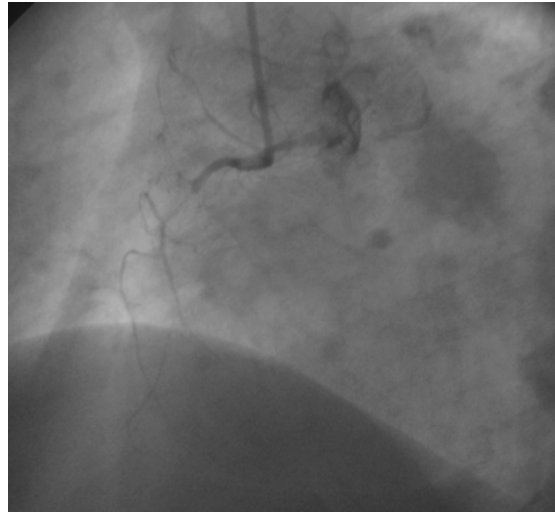
>10	Οξεία φάση λοίμωξης
>0.5 και <10	Καρδιαγγειακός κίνδυνος
<0.5	Φυσιολογική τιμή

### **Στεφανιαία αγγειογραφία**

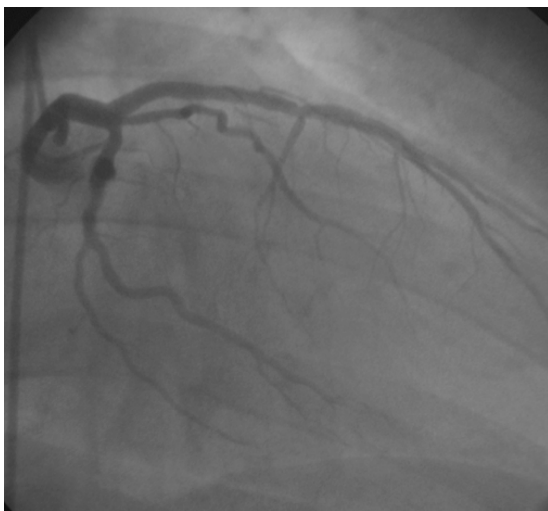
Η στεφανιαία αγγειογραφία διενεργήθηκε με καθετηριασμό της μηριαίας αρτηρίας με την τεχνική του Seldinger. Κατά αυτή ειδική βελόνη εισήχθη από το δέρμα στη μηριαία αρτηρία και όταν εμφανιστηκε αρτηριακή ροή εισήχθη διαμέσου του αυλού της βελόνης, οδηγό σύρμα. Η βελόνη αφαιρέθηκε και γύρω από το οδηγό σύρμα ωθήθηκε ειδικό πλαστικό θηκάρι (μεγέθους 5-6F), το οποίο τοποθετήθηκε στο αγγείο και διαμέσου αυτού εισήχθησαν στη συνέχεια οι καθετήρες. Χρησιμοποιήθηκαν προσχηματισμένοι καθετήρες Judkins, οι οποίοι προωθήθηκαν κάτω από ακτινοσκοπικό έλεγχο μέχρι τη ρίζα της αορτής, όπου με κατάλληλους χειρισμούς εντόπιζαν τα στόμια των στεφανιαίων αγγείων.<sup>347</sup> Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν δύο καθετήρες (ένας για την αριστερή στεφανιαία αρτηρία και ένας για τη δεξιά). Έγινε έγχυση κατάλληλης ποσότητας σκιαγραφικής ουσίας για την απεικόνιση του εσωτερικού αυλού των στεφανιαίων αγγείων. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο η δεξιά όσο και η αριστερή πρόσθια λοξή προβολή σε διάφορες μοίρες για την όσο το δυνατόν καλύτερη απεικόνιση των στενώσεων των στεφανιαίων αγγείων (**εικόνα 8**).

**Εικόνα 8. Στιγμιότυπα από τη στεφαναία αγγειογραφία δυο συμμετεχόντων στη μελέτη**

**A.**



**B.**



A: Ασθενής με σοβαρές στενώσεις (>90%) στον πρόσθιο κατιόντα κλάδο της αριστερής στεφαναίας αρτηρίας και στη δεξιά στεφαναία αρτηρία (2αγγειακή ΣΝ), B: Ασθενής με σημαντική στένωση στη δεξιά και χωρίς σημαντικές στενώσεις στη αριστερή στεφαναία αρτηρία (1αγγειακή ΣΝ).

Η σοβαρότητα της απόφραξης των στεφαναίων αγγείων εκτιμήθηκε από δύο ανεξάρτητους καρδιολόγους. Όλοι οι εξεταζόμενοι ασθενείς παρουσίασαν αθηρωματικές πλάκες στα στεφαναία τους αγγεία. Τα αποτελέσματα κατηγοριοποίησαν τους ασθενείς σε τρεις ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των

αγγείων που εμφάνισαν απόφραξη του αυλού μεγαλύτερη από 50%: την ομάδα με αθηρωματικά στεφανιαία αγγεία χωρίς σημαντικού βαθμού στενώσεις ή 1 στένωση >50% στα στεφανιαία αγγεία (ομάδα  $\leq 1$ αγγειακής νόσου), την ομάδα με 2 στενώσεις >50% σε διαφορετικά στεφανιαία αγγεία (ομάδα 2αγγειακής νόσου) και την ομάδα με στενώσεις >50% και στις 3 μεγάλες στεφανιαίες αρτηρίες (ομάδα 3αγγειακής νόσου). Η κατάταξη χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των γονοτυπικών διαφορών μεταξύ των ομάδων αυτών.

### **Γενετική ανάλυση**

Η γενετική ανάλυση των δειγμάτων αίματος διενεργήθηκε σχεδόν στο σύνολό της στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

*Απομόνωση του DNA από δείγμα περιφερικού αίματος:* Το DNA των ασθενών απομονώθηκε από 2ml περιφερικού αίματος, που ελήφθησαν με πρωινή αιμοληψία. Η απομόνωση διενεργήθηκε με τη βοήθεια ενός εμπορικά διαθέσιμου προϊόντος (Puregene DNA extraction kit; Gentra Systems, Inc., Research Triangle Park, NC) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το Puregene DNA extraction kit περιέχει 4 διαφορετικά διαλύματα, τα οποία είναι απαραίτητα για την απομόνωση του γενετικού υλικού από το δείγμα αίματος. Συγκεκριμένα, περιέχονται τα διαλύματα: Διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Red Blood Cell Lysis Solution), διάλυμα λύσης των κυττάρων (Cell Lysis Solution), διάλυμα παρασκευής πρωτεϊνών (Protein Precipitation Solution) και διάλυμα ενυδάτωσης (DNA Hydration Solution). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του DNA ήταν η εξής:

- α) Συλλογή 2ml αίματος σε φιαλίδιο γενικής αίματος, που περιείχε αντιπηκτικό  $K_3EDTA$
- β) Προσθήκη 2ml αίματος σε ένα φιαλίδιο των 15ml που περιείχε 6ml του διαλύματος Red Blood Cell Lysis Solution
- γ) Παραμονή του μίγματος για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη συνεχή ανακίνηση, ώστε να πραγματοποιηθεί αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων
- δ) Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά

- ε) Αφαίρεση του υπερκείμενου εκτός από 200-400μl που παρέμεναν στο φιαλίδιο μαζί με το νεοσχηματιζόμενο ίζημα
- στ) Ανάδευση σε ρόδα (vortex) για 2 λεπτά
- ζ) Προσθήκη 2ml Cell Lysis Solution και ανάδευση με σκοπό τη διάλυση των κυττάρων
- η) Παραμονή στους 37°C (κλίβανο) μέχρι το διάλυμα να ομογενοποιηθεί. Η διαδικασία αυτή διαρκούσε άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα (από 10 έως και 45 λεπτά)
- θ) Επαναφορά του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου
- ι) Προσθήκη 0.67ml διαλύματος Protein Precipitation Solution
- ια) Ανακίνηση σε vortex με υψηλή ταχύτητα για 20sec μέχρι την ομογενοποίηση του περιεχομένου του φιαλιδίου
- ιβ) Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 λεπτά
- ιγ) Προσθήκη του υπερκείμενου (άνωθεν της νεοσχηματισμένης καφέ στιβάδας των πρωτεϊνών) σε νέο φιαλίδιο 15ml που περιείχε 2ml ισοπροπανολόλης
- ιδ) Ανακίνηση του μίγματος έως τον σχηματισμό των «ίνων» του DNA
- ιε) Φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 3 λεπτά (δημιουργία λευκής στιβάδας DNA)
- ιστ) Αφαίρεση υπερκείμενου υγρού και αποστράγγιση του φιαλιδίου σε καθαρό απορροφητικό χαρτί
- ιζ) Προσθήκη 2ml αιθανόλης 70%
- ιη) Ανακίνηση του φιαλιδίου για διάστημα 2 λεπτών (ξέπλυμα του DNA)
- ιθ) Φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 1 λεπτό
- κ) Προσεκτική αφαίρεση της αιθανόλης και στέγνωμα του DNA για 24 ώρες
- κα) Προσθήκη 160μl DNA Hydration Solution και ανάδευση μέχρι την όσο το δυνατό καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος
- κβ) Φύλαξη των δειγμάτων DNA στους 4°C για μικρό χρονικό διάστημα



*Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωθέντος DNA:* Η συγκέντρωση του DNA στα παραγόμενα διαλύματα προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε κατάλληλο μήκος κύματος στην υπεριώδη ακτινοβολία σε φωτομετρικό μηχάνημα του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Η μέτρηση έδωσε τη δυνατότητα επαλήθευσης της παρουσίας μορίων DNA στο παρασκευασθέν διάλυμα και υπολογισμού της πυκνότητας του διαλύματος αυτού. Σε διαλύματα πολύ αυξημένης πυκνότητας έγινε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας DNA Hydration Solution με σκοπό την αραιώσή τους.

*Ενίσχυση των υπό εξέταση αλληλουχιών DNA με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) - Γενικές αρχές της PCR:* Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος που επιτρέπει την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του DNA (αλληλουχίες), τα οποία μπορεί να περιέχουν νουκλεοτιδικές αλυσίδες, τμήματα γονιδίων ή και ολόκληρα γονίδια. Το πρακτικό όφελος της αντίδρασης έγκειται στο γεγονός ότι υποσκελίζει την εγγενή αδυναμία ανάλυσης και μελέτης ενός μοναδικού μορίου DNA και των τμημάτων αυτού. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων της αλληλουχίας του DNA που ενδιαφέρουν τον ερευνητή, έχοντας ως αφετηρία πολύ μικρή ποσότητα γενετικού υλικού. Πιο συγκεκριμένα η PCR αποτελεί πειραματικό μοντέλο του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Η διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού επιτελείται σε κυτταρικό επίπεδο στον πυρήνα του κυττάρου από ένζυμα που προκαλούν το διπλασιασμό του γενετικού υλικού, προετοιμάζοντας το κύτταρο για τη μίτωση. Επιπλέον, τμηματική αντιγραφή του DNA πραγματοποιείται και σε καταστροφή τμημάτων αυτού, οπότε με μήτρα την άθικτη άλυσσο κατασκευάζεται εκ νέου μια νουκλεοτιδική αλυσίδα. Για την αποτελεσματική διενέργεια της PCR απαιτείται η παρουσία του ενζύμου DNA πολυμεράση I. Όπως και στις *in vivo* συνθήκες, έτσι και *in vitro* η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνα μόρια DNA ως εκμαγεία για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων με κατεύθυνση 5'-3'. Η αποδιάταξη της ελικοειδούς μορφής του μορίου του DNA και η παραγωγή μονόκλωνων μορίων μπορεί να επιτελεστεί με τη αύξηση της θερμοκρασίας του αρχικού μορίου, οπότε διασπώνται οι γέφυρες μεταξύ των νουκλεοτιδίων και οι συμπληρωματικές αλυσίδες αποχωρίζονται. Το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA είναι προκαθορισμένο από τον ερευνητή ανάλογα με το υπό διερεύνηση τμήμα του γενετικού υλικού. Κατά τη διενέργεια της PCR απαιτείται η

χρήση ενός σηματοδότη του σημείου έναρξης. Το ρόλο αυτό παίζουν διαθέσιμα στο εμπόριο ολιγονουκλεοτιδικά μόρια, οι εκκινητές (primers), που διακρίνονται σε ευθείς και αντίστροφους και οριοθετούν εξειδικευμένα περιοχές του ανθρώπινου DNA.

Απαιτείται λοιπόν η χρήση διπλάσιων εκκινητών από τον αριθμό των αλληλουχιών που επιχειρείται να απομονωθούν με την PCR. Επίσης, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν και οι δύο κλώνοι του DNA ως εκμαγεία. Κατά τον πρώτο κύκλο της PCR ο εκκινητής ενεργοποιεί την αντιγραφή από το σημείο που αυτός συνδέεται με την αλυσίδα του DNA και με κατεύθυνση 5' προς 3'. Στο τέλος του πρώτου κύκλου παράγονται διπλάσια μόρια DNA, τα οποία με τη σειρά τους αποτελούν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο της PCR, καθώς φέρουν και τις θέσεις σύνδεσης του εκκινητή. Έτσι, μετά από πολλούς κύκλους ο αριθμός των αντιγράφων του υπό διερεύνηση τμήματος του DNA αυξάνεται εκθετικά, με αποτέλεσμα τη παραγωγή ποσότητας ικανής να αναλυθεί με μεθόδους όπως η ηλεκτροφόρηση και το sequencing. Τα πρώτα προϊόντα προέκτασης, που προέρχονται από το αρχικό DNA, δε χαρακτηρίζονται από σταθερό μήκος, ενώ στους επόμενους κύκλους σχηματίζεται σε πολλή μεγάλη περίσσεια το ειδικό προϊόν. Η παραπάνω διαδικασία που επιτελείται με την αντίδραση PCR ονομάζεται εκθετική ενίσχυση (amplification) της υπό εξέταση αλληλουχίας DNA.

*Εκκινητές και διαλύματα εργασίας:* Με βάση τις γενετικές ακολουθίες των γονιδίων AGT, ACE, REN και NPRA, που είναι διαθέσιμες στη βάση δεδομένων GeneBank και με τη χρήση του λογισμικού Primer3 ([www.justbio.com](http://www.justbio.com)) σχεδιάστηκαν οι συγκεκριμένοι εκκινητές που κρίθηκαν κατάλληλοι για την εισαγωγή στη φάση του πολλαπλασιασμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για το γονίδιο του AGT χρησιμοποιήθηκε ο ευθύς εκκινητής 5'-Cy5.5-AATGGGAAGTTAGGTCAGGATAGA-3' και ο αντίστροφος 5'-GCACTTGCAACTCCAGGAAGAC-3', που ενισχύουν το δινουκλεοτιδικό πολυμορφισμό επανάληψης (CA)<sub>n</sub> στην 3' ανοδική περιοχή του γονιδίου. Με τη χρήση του ευθέως εκκινητή 5'-GGGACTCTGTAAGCCACTGC-3' και του αντίστροφου -5'-CCATGCCATAACAGGTCTT-3' απομονώθηκε ο πολυμορφισμός ACE I/D. Ο γονότυπος μελετήθηκε με τη βοήθεια της PCR, η οποία πολλαπλασίασε το μήκος 492bp τμήμα του γονιδίου του ACE. Στην περίπτωση της παρουσίας του D αλληλίου το τμήμα αυτό υπολείπεται σε 250 bp. Για το γονίδιο της REN χρησιμοποιήθηκαν ο ευθύς εκκινητής 5'-Cy5.5-GAGGTGCCCCATCAGCCT-3' και ο αντίστροφος 5'-CATCAAACAGCCTCTTCTTGG-3', οι οποίοι ενισχύουν τον τετρανουκλεοτιδικό πολυμορφισμό επανάληψης (TCTG)<sub>n</sub> στο εσόνιο 7, ενώ για την

ενίσχυση του (CT)η πολυμορφισμού επανάληψης του γονιδίου του NPRA της θέσης -293 στην περιοχή του promoter του γονιδίου, απαιτήθηκαν ο ευθύς εκκινητής 5'-Cγ5.5-CTCACGCACGCTACAAACAC-3' και ο αντίστροφος 5'-AGGACCCGAGTGTGAACAAC-3'. Για τους σκοπούς της ανάλυσης σχηματίστηκαν αραιωμένα διαλύματα των εκκινητών (διαλύματα εργασίας) με συγκεντρώσεις ικανές να επιτελέσουν τη διαδικασία ενίσχυσης των υπό εξέταση πολυμορφισμών. Τα γενικά χαρακτηριστικά των πολυμορφισμών, οι εκκινητές, τα διαλύματα αυτών καθώς και άλλα χαρακτηριστικά των πολυμορφισμών συνοψίζονται στον **πίνακα 8**.

*Οι φάσεις της PCR:* Τα παραγόμενα διαλύματα κατά την εισαγωγή τους στην PCR για επεξεργασία υποβλήθηκαν σε διαδοχικούς κύκλους που περιελάμβαναν τρεις διακριτές φάσεις:

α) Αποδιάταξη: Αποχωρισμός δίκλωνων μορίων DNA και παραγωγή μονόκλωνων αλυσίδων πάνω στις οποίες θα επιδράσουν οι εκκινητές και το ένζυμο (DNA πολυμεράση).

β) Επανασύνδεση: Πρόσδεση των εκκινητών στα μονόκλινα μόρια του DNA σε συνθήκες μειωμένης θερμοκρασίας με σκοπό τη σηματοδότηση των περιοχών αντιγραφής του νουκλεοτιδικού οξέως, οι οποίες περιέχουν τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς. Στους υπό εξέταση πολυμορφισμούς η χρονική περίοδος της σύνθεσης ήταν μικρότερη για το ACE και μεγαλύτερη για τους 3 υπόλοιπους πολυμορφισμούς.

γ) Σύνθεση: Σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας και υπό την επίδραση της ειδικής DNA πολυμεράσης. Παράγωγή αντιγράφων των οριοθετημένων από τους εκκινητές περιοχών με βαθμό εκθετικό σε κάθε κύκλο της PCR. Η διάρκεια αυτού του σταδίου, καθότι καθορίζεται από το μέγεθος του νουκλεοτιδικού τμήματος που αντιγράφεται, ποικίλει. Στους υπό εξέταση πολυμορφισμούς η χρονική περίοδος της σύνθεσης ήταν μικρότερη για το ACE και μεγαλύτερη για τους 3 υπόλοιπους πολυμορφισμούς.

**Πίνακας 8: Γενικά χαρακτηριστικά, εκκινητές και διαλύματα εργασίας των υπό εξέταση πολυμορφισμών**

Γονίδια	Χαρακτηριστικά	Εκκινητές	Μέγεθος (bp)	Διάλυμα εμπορίου (pmol/ml)	Διάλυμα εργασίας (20 pmol/ml) Διάλυμα εμπορίου + H <sub>2</sub> O
<b>NPRA</b>	(CT) <sub>n</sub>	F: 5'-Cy5.5-CTCAGCAGCAGCTACAAAACAC-3' R: 5'-AGGACCCGAGTGTGAACAAC-3'	148	F: 458 R: 316	F: 4.4 + 95.6 R: 6.3 + 93.7
<b>ACE</b>	250bp (I/D)	F: 5'-GGGACTCTGTAAGCCACTGC-3' R: 5'-CCATGCCCATAACAGGTCTT-3'	242 (D) 492 (I)	F: 311 R: 371	F: 6.4 + 93.6 R: 5.4 + 94.6
<b>AGT</b>	(CA) <sub>n</sub>	F: 5'-Cy5.5-AATGGGAAGTTAGGTCAGGATAGA-3' R: 5'-GCACTTGCAACTCCAGGAAGAC-3'	19-188	F: 338 R: 293	F: 5.9 + 94.1 R: 6.8 + 93.2
<b>REN</b>	(TCTG) <sub>n</sub>	F: 5'-Cy5.5-GAGGTGCCCCCATCAGCCT-3' R: 5'-CATCAAAACAGCCTCTTCTTGG-3'	7-206	F: 685 R: 338	F: 2.9 + 97.1 R: 5.9 + 94.1

F (forward): ευθύς εκκινητής; R (reverse): αντίστροφος εκκινητής

*Ενίσχυση του πολυμορφισμού του ACE:* Για την παρασκευή του διαλύματος που θα εισάγονταν στην PCR για την ενίσχυση του πολυμορφισμού του ACE από κάθε διάλυμα DNA παρασκευάστηκε μικτό διάλυμα σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του **πίνακα 9:**

**Πίνακας 9: Διάλυμα PCR για τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου του ACE**

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
Πολυμεράση	12.5
Ευθύς εκκινητής	1
Αντίστροφος εκκινητής	1
H <sub>2</sub> O	8.5
DNA	2

**Πίνακας 10: Οι θερμικές συνθήκες της PCR για την ενίσχυση του πολυμορφισμού του ACE**

ΦΑΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ DNA	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΙΚΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ
Αποδιάταξη 1 κύκλος	95°C	15 min
Αποδιάταξη	95°C	30 sec
Επανασύνδεση	58°C	40 sec
Σύνθεση	72°C	40 sec
Σύνθεση 1 κύκλος	72°C	10 min
Φύλαξη	4°C	-

Οι θερμικές συνθήκες για την ενίσχυση του πολυμορφισμού του ACE κατά την PCR καταγράφονται στον **πίνακα 10**.

*Ενίσχυση των πολυμορφισμών των AGT, REN και NPRA:* Μια πολλαπλή αντίδραση με PCR διενεργήθηκε με σκοπό την ανάλυση των υπολοίπων 3 πολυμορφισμών σε ένα μίγμα όγκου 25 μl που περιείχε 50 ng του γενετικού υλικού (DNA), 5 pmol από κάθε εκκινητή και 12.5 μl από Ταq πολυμεράση Master Mix (Multiplex PCR kit – Qiagen Science, Maryland, USA). Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα μίξης των εκκινητών (Primers Mix) με την ανάμιξη 20μl από κάθε αραιωμένο διάλυμα εκκινητή (διαλύματα εργασίας) των γονιδίων AGT, REN και NPRA. Συνολικά η ποσότητα του Primers Mix ήταν 20μl x 3= 60μl.

Για την παρασκευή του διαλύματος της PCR για την ενίσχυση του πολυμορφισμού των τριών προαναφερόμενων γονιδίων από κάθε διάλυμα DNA παρασκευάστηκε μικτό διάλυμα σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του **πίνακα 11**:

**Πίνακας 11: Διάλυμα PCR για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων AGT, REN και NPRA**

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
Πολυμεράση	12.5
Primers Mix	2.5
H <sub>2</sub> O	8
DNA	2

Οι θερμικές συνθήκες για την ενίσχυση του πολυμορφισμού των AGT, REN και NPRA κατά την PCR καταγράφονται στον **πίνακα 12**:

**Πίνακας 12: Οι θερμικές συνθήκες της PCR για την ενίσχυση των πολυμορφισμών των γονιδίων AGT, REN και NPRA**

ΦΑΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ DNA		ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΙΚΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ
Αποδιάταξη	1 κύκλος	95°C	15 min
Αποδιάταξη	38 κύκλοι	95°C	30 sec
Επανασύνδεση		58°C	90 sec
Σύνθεση		72°C	90 sec
Σύνθεση	1 κύκλος	72°C	10 min
Φύλαξη		4°C	-

*Ανάγνωση των αποτελεσμάτων του I/D πολυμορφισμού του ACE:* Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλης αγαρόζης 3% και τα αποτελέσματα έγιναν ορατά με τη χρήση υπεριώδους φωτισμού μετά από προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. Η παρασκευή της γέλης αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με τελικό προϊόν ποσότητας 300ml και πυκνότητας 3% ως εξής:

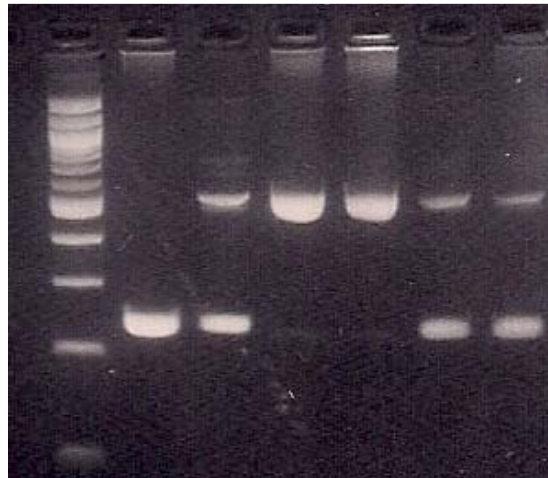
- α) Προσθήκη σε κωνική φιάλη 9gr αγαρόζης και 300ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE πυκνότητας 1%
- β) Καλή ανακίνηση του μίγματος
- γ) Τοποθέτηση της φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων και επώαση σε σημείο βρασμού
- δ) Συχνή διακοπή της διαδικασίας για ανάδευση με σκοπό την πλήρη ομογενοποίηση του μίγματος (εξαφάνιση όλων των ορατών «ινών» αγαρόζης)
- ε) Προσθήκη 15-20ml βρωμιούχου αιθιδίου
- στ) Στερεοποίηση του μίγματος σε κατάλληλη μήτρα με θέσεις υποδοχής του DNA με σκοπό τη δημιουργία της γέλης

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια χρωστική που καθιστά ορατό το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης (με τη χρήση υπεριώδους φωτισμού) και λόγω της φικόλλης, μιας μακρομοριακής ουδέτερης ουσίας που περιέχει, επιτρέπει τη σταθερότερη κίνηση του DNA μέσα στο διάλυμα αγαρόζης (μεγαλύτερη πυκνότητα του προς μετακίνηση υλικού). Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλες οριζόντιες συσκευές με σταθερή διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο τους άκρων, που είχαν δυνατότητα ταυτόχρονης διεκπεραίωσης της ηλεκτροφόρησης περίπου 80 δειγμάτων DNA (με δεδομένο το μέγεθος της γέλης και το πλάτος των υποδοχών DNA που σχηματίστηκαν πάνω σε αυτή). Για την ορθή ανάγνωση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης και την εξαγωγή του ακριβούς γονοτύπου του I/D πολυμορφισμού του γονιδίου του ACE, χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα σε κάθε ακραία θέση υποδοχής της γέλης 2 ειδών δείκτες. Οι δείκτες είναι προπαρασκευασμένα διαλύματα που περιέχουν γνωστού μεγέθους τμήματα DNA, προερχόμενα από DNA λ φάγου μετά από επεξεργασία με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες: 1) ο 100bp Ladder (K180-250ml), που περιείχε τμήματα DNA μεγέθους 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 και 3000bp και 2) ο φX174 DNA-Hae III Digest, που περιείχε τμήματα DNA μεγέθους 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078 και 1353bp. Μετά από περίπου 45 λεπτά, όταν τα υπό εξέταση δείγματα DNA είχαν διανύσει τουλάχιστον τα 3/5 του ύψους της γέλης, η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διακόπτονταν και τα αποτελέσματα καταγράφονταν μετά από εφαρμογή υπεριώδους φωτισμού. Με βάση τους συνυπάρχοντες δείκτες έγινε η επαλήθευση του μήκους των αλληλίων DNA του πολυμορφισμού I/D του γονιδίου του ACE (492bp για το I αλληλίο- 242 για το D αλληλίο) (εικόνα 9).

*Ανάγνωση αποτελεσμάτων του  $(CA)_n$  πολυμορφισμού επανάληψης του AGT, του  $(TCTG)_n$  πολυμορφισμού της REN και του  $(CT)_n$  πολυμορφισμού του NPRA:* Όλοι οι ευθείς εκκινήτες για τους άνωθεν πολυμορφισμούς ήταν σημασμένοι με Cy5.5 (Proligo LLC, Boulder, CO, USA). Ένα δείγμα του μικτού διαλύματος που προέκυψε μετά τη διενέργεια PCR αναμίχθηκε με μια ειδική χρωστική και με δείκτες μεγέθους 50 και 300bp (Visible Genetics, Inc.). Στη συνέχεια θερμάνθηκε στους 95°C για 5 λεπτά, ψύχθηκε στον πάγο και διαχωρίστηκε σε γέλη πολυακρυλαμιδίου 6%. Τα μεγέθη των τμημάτων των αλληλίων εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια εξωτερικών δεικτών από έναν αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών DNA (sequencer) και αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Fragment Analysis Software (Visible Genetics, Inc).



### Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR για τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου του ACE



Η πρώτη θέση κατέχεται από τον δείκτη 100bp Ladder και οι υπόλοιπες (από αριστερά προς τα δεξιά) από άτομα με γονότυπο DD, ID, II, ID και ID αντίστοιχα

#### Στατιστική ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν με τη χρήση μέσων  $\pm 1$  σταθερά διακύμανση, ενώ οι κατηγορικές με τη βοήθεια ποσοστών. Οι διαφορές στις συνεχείς μεταβλητές μεταξύ των ομάδων ΣΝ και ελέγχου εξετάστηκαν με τη βοήθεια της στατιστικής μεθόδου unpaired Student t- test. Με βάση τον αριθμό των επαναλήψεων τα αλληλία των AGT και REN κατηγοριοποιήθηκαν σε βραχεία (short-S) ή μακρά (long-L) με τη διάμεση τιμή να ορίζει το όριο μεταξύ των δύο μορφών (αλληλία που περιείχαν περισσότερες του διαμέσου επαναλήψεις= μακρά – L).<sup>348</sup> Τα αλληλία του NPRA γονιδίου εμφάνισαν 10 και 11 επαναλήψεις του υπό εξέταση πολυμορφισμού και θεωρήθηκαν βραχεία και μακρά αντίστοιχα. Η απόκλιση από την ισορροπία του Hardy-Weinberg και οι διαφορές στην κατανομή των αλληλίων μεταξύ των δύο ομάδων αναλύθηκαν με τη βοήθεια της στατιστικής δοκιμασίας  $\chi^2$ -test με 1 βαθμό ελευθερίας, ενώ οι διαφορές στην κατανομή των γονοτύπων μεταξύ ασθενών και υγείων με τη χρήση του  $\chi^2$ -test με 2 βαθμούς ελευθερίας. Διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ αλληλίων ή γονοτύπων και της παρουσίας ΣΝ, καθώς και μεταξύ γονοτύπων και της 3αγγειακής ΣΝ και υπολογίστηκε ο σχετικός κίνδυνος (ΣΚ) με 95% διάστημα εμπιστοσύνης (ΔΕ). Με σκοπό την εξακρίβωση του ανεξάρτητου ρόλου διαφόρων

παραγόντων που επηρέασαν την παρουσία ή μη της ΣΝ, σχεδιάστηκε ένα μοντέλο μονοπαραγοντικής (univariate) ανάλυσης παλινδρόμησης με την παρουσία της ΣΝ ως διχότομης εξαρτημένης μεταβλητής και την ηλικία, το BMI, τη SBP, τη DBP, τη hsCRP, τα λιπίδια πλάσματος, και τους γονοτύπους των πολυμορφισμών του AGT και της REN ως ανεξάρτητους παράγοντες. Ακολούθως υπολογίστηκε ένα μοντέλο πολυπαραγοντικής ανάλυσης παλινδρόμησης (multivariate) με σκοπό την εξακρίβωση των παραγόντων που εμφάνισαν ανεξάρτητη επίδραση στη διχότομη εξαρτημένη μεταβλητή (παρουσία ΣΝ). Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις της hsCRP μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων διερευνήθηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) με επακόλουθη ανάλυση κατά Dunnett's T3. Το όριο σημαντικότητας για κάθε ανάλυση τέθηκε σε επίπεδο  $\alpha=0.05$ . Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

### III. Αποτελέσματα

#### ***Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα***

Τα βασικά δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των δύο ομάδων της μελέτης συνοψίζονται στον **Πίνακα 13**. Παρατηρήθηκε στατιστικώς αυξημένη συχνότητα ανδρών (69.0% έναντι 42.8%,  $p<0.001$ ), εν ενεργεία καπνιστών (51.9% έναντι 28.3%,  $p<0.001$ ), υπερτασικών (46.2% έναντι 0%,  $p<0.001$ ) και ατόμων με ιστορικό υπερλιπιδαιμίας (23.1% έναντι 0%) στην ομάδα της ΣΝ σε σύγκριση με τη ομάδα ελέγχου (**Γράφημα 1**).

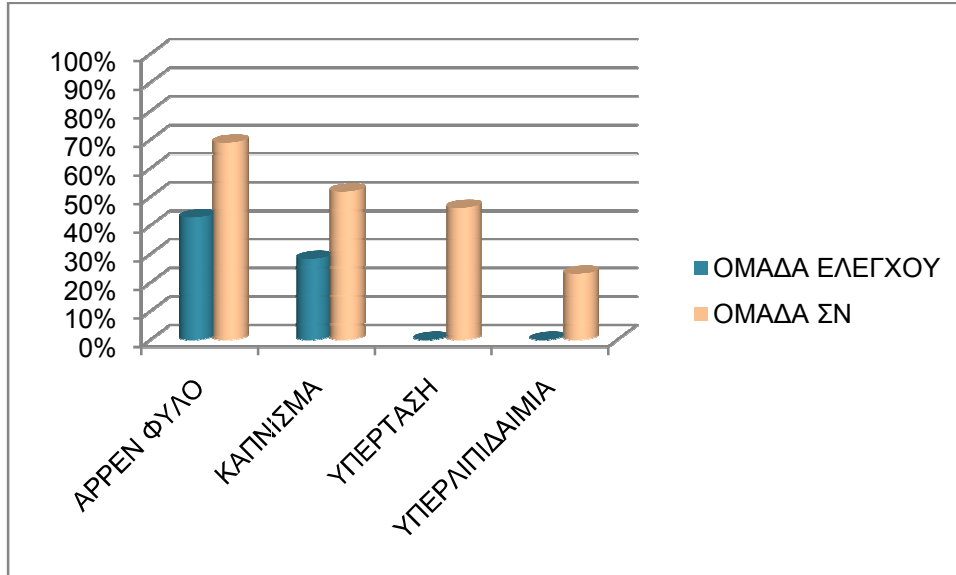
Από τις υπόλοιπες παραμέτρους η SBP, η DBP, το BMI, η hsCRP και η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) ήταν σημαντικά αυξημένες στην ομάδα της ΣΝ, ενώ το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας και η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) ήταν σημαντικά μειωμένα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (**Γράφημα 2**). Δεν εμφανίστηκαν άλλες διαφορές στις υπόλοιπες δημογραφικές, κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους.

**Πίνακας 13. Δημογραφικές, κλινικές και εργαστηριακές παράμετροι των ομάδων ΣΝ και ελέγχου**

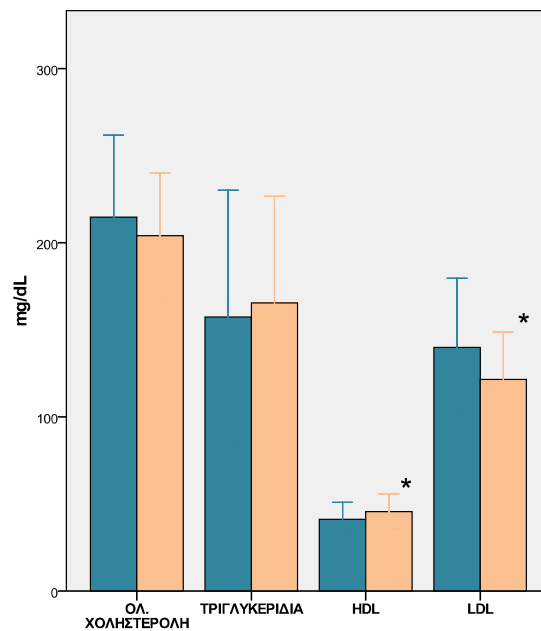
Παράμετρος	Ομάδα Ελέγχου (n=144)	Ομάδα ΣΝ (n=158)
Ηλικία (έτη)	68.6±10.2	67.3±8.2
Κλάσμα εξώθησης (%)	57±7	49±10*
SBP (mmHg)	124±7	134±18*
DBP (mmHg)	68±8	77±10*
Καρδιακή συχνότητα (bpm)	74.0±15.8	71.7±11.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.25±2.35	26.67±2.70*
hsCRP (mg/dL)	0.71±0.73	2.43±4.15*
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	14.08±1.26	13.89±1.39
Ουρία (mg/dl)	36.18±6.77	39.2±10.82
Κρεατινίνη (mg/dl)	0.95±0.13	0.97±0.20
Νάτριο ορού (mmol/l)	141.16±4.46	139.86±4.13
Κάλιο ορού (mmol/l)	4.29±0.39	4.31±0.48
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	204.11±36.05	213.69±46.80
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	165.47±61.23	156.05±73.24
HDL (mg/dl)	45.63±10.05	41.30±9.78*
LDL (mg/dl)	121.58±27.11	140.41±39.64*

SBP: συστολική αρτηριακή πίεση, DBP: διαστολική αρτηριακή πίεση, BMI: δείκτης μάζας σώματος, hsCRP: υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, LDL: χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, \*p<0.05.

**Γράφημα 1: Επιπολασμός μειζόνων παραγόντων κινδύνου για ΣΝ στις υπό εξέταση ομάδες πληθυσμού**



**Γράφημα 2: Συγκεντρώσεις λιπιδίων στον ορό (mg/dL) στις υπό εξέταση ομάδες πληθυσμού (\* $p < 0.05$ ).**



**Συχνότητες γονοτύπων των πολυμορφισμών AGT (CA)<sub>n</sub>, ACE I/D, REN (TCTG)<sub>n</sub> και NPRA (CT)<sub>n</sub>**

Η συχνότητα των γονοτύπων του ACE, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων των υπόλοιπων τριών πολυμορφισμών πριν το μετασχηματισμό τους σε ομάδες S και L δεν απέκλιναν από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

**Πίνακας 14. Σχετικές συχνότητες γονοτύπων των πολυμορφισμών AGT (CA)<sub>n</sub>, ACE I/D, REN (TCTG)<sub>n</sub> και NPRA (CT)<sub>n</sub> και του D αλληλίου του I/D πολυμορφισμού του ACE στις ομάδες ελέγχου και ΣΝ**

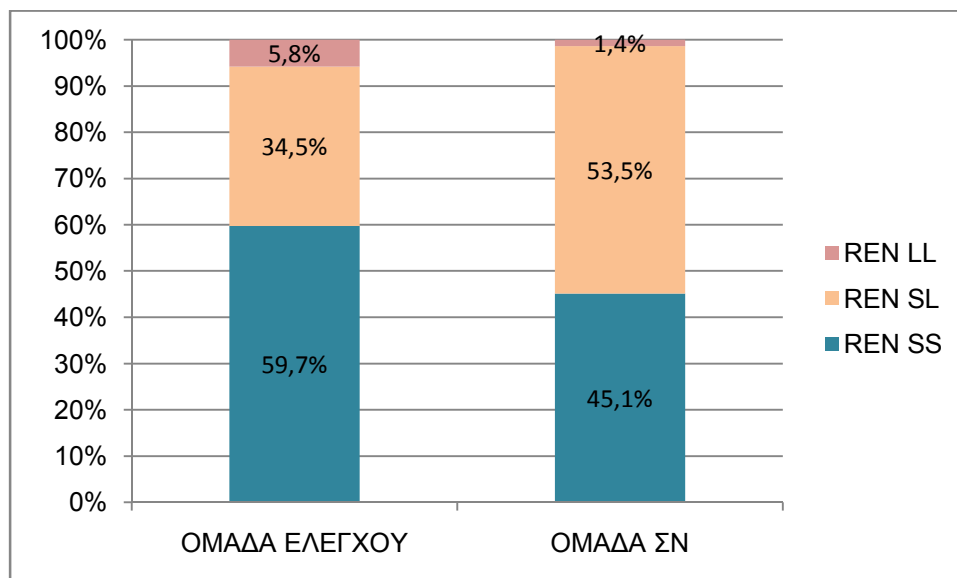
Πολυμορφισμός/Ομάδα	Γονότυποι			
<b>AGT (CA)<sub>n</sub></b>	<b>SS (%)</b>	<b>SL (%)</b>	<b>LL (%)</b>	
Ομάδα ελέγχου	0.404	0.419	0.176	
Ομάδα ΣΝ	0.500	0.329	0.171	
<b>ACE I/D</b>	<b>II (%)</b>	<b>ID (%)</b>	<b>DD (%)</b>	<b>Αλληλίο D (%)</b>
Ομάδα ελέγχου	0.176	0.423	0.401	0.613
Ομάδα ΣΝ	0.098	0.451	0.451	0.676
<b>REN (TCTG)<sub>n</sub>*</b>	<b>SS (%)</b>	<b>SL (%)</b>	<b>LL (%)</b>	
Ομάδα ελέγχου	0.597	0.345	0.058	
Ομάδα ΣΝ	0.451	0.535	0.014	
<b>NPRA (CT)<sub>n</sub></b>	<b>SS (%)</b>	<b>SL (%)</b>	<b>LL (%)</b>	
Ομάδα ελέγχου	0.202	0.596	0.202	
Ομάδα ΣΝ	0.242	0.500	0.258	

AGT: αγγειοτενσινογόνο, ACE: μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης, REN: ρενίνη, NPRA: υποδοχέας A του νατριουρητικού πεπτιδίου, S: βραχύ, L: μακρό, I: εισαγωγή, D: έλλειψη, \*: Σημαντικές διαφορές στις γονοτυπικές συχνότητες μεταξύ ασθενών και υγείων (p<0.05).

Ο αριθμός των CA επαναλήψεων του γονιδίου του AGT κυμαινόταν μεταξύ 8-19 (διάμεσος= 13) και ήταν κατά μέσο όρο παρόμοιος στην ομάδα της ΣΝ και στην ομάδα ελέγχου ( $12.73 \pm 1.89$  έναντι  $13.17 \pm 1.81$ , αντίστοιχα,  $p$ =μη σημαντικό-ΜΣ). Ο αριθμός των TCTG επαναλήψεων του γονιδίου της REN κυμαινόταν μεταξύ 6-10 (διάμεσος= 6) και ήταν επίσης παρόμοιος στις δύο ομάδες ( $6.83 \pm 1.40$  έναντι  $6.62 \pm 1.14$ ,  $p$ =ΜΣ). Η συχνότητα των (CT) επαναλήψεων στον πολυμορφισμό του γονιδίου του NPRA εμφάνισε μόνο δύο τιμές (10 και 11). Οι μέσες τιμές των επαναλήψεων δε διέφεραν μεταξύ της ομάδας της ΣΝ και της ομάδας ελέγχου ( $10.51 \pm 0.5$  έναντι  $10.51 \pm 0.5$ ,  $p$ =ΜΣ).

Οι συχνότητες των γονοτύπων των τεσσάρων πολυμορφισμών και των αλληλίων του ACE πολυμορφισμού εμφανίζονται στον **Πίνακα 14**. Μόνο σε ότι αφορά τον πολυμορφισμό (TCTG)η του γονιδίου της REN εμφανίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των γονοτύπων ( $p < 0.05$ ) (**Γράφημα 3**).

**Γράφημα 3. Συχνότητα γονοτύπων του (TCTG)η πολυμορφισμού του γονιδίου της REN**



**Πίνακας 15. Σχετικός κίνδυνος (ΣΚ) με 95% διαστήμα εμπιστοσύνης (ΔΕ) για την παρουσία της ΣΝ ως προς τους πολυμορφισμούς AGT (CA)<sub>n</sub>, ACE I/D, REN (TCTG)<sub>n</sub> και NPRA (CT)<sub>n</sub>**

Γονότυπος	ΣΚ	95% ΔΕ
<b>AGT (CA)<sub>n</sub></b>		
SS	1.473	0.924-2.347
SL	0.679	0.421-1.097
LL	0.963	0.526-1.763
<b>ACE I/D</b>		
II	0.509	0.259-1.001
ID	1.123	0.709-1.778
DD	1.225	0.772-1.943
D αλλήλιο	1.322	0.943-1.853
<b>REN (TCTG)<sub>n</sub></b>		
SS	0.554	0.345-0.888*
SL	2.183	1.352-3.526*
LL	0.234	0.055-0.996*
<b>NPRA (CT)<sub>n</sub></b>		
SS	1.263	0.599-2.666
SL	0.679	0.361-1.276
LL	1.369	0.654-2.868

AGT: αγγειοτενσινογόνο, ACE: μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης, REN: ρενίνη, NPRA: υποδοχέας A του νατριουρητικού πεπτιδίου, S: βραχύ, L: μακρό, I: εισαγωγή, D: έλλειψη, \*: p<0.05.

***Επίδραση των πολυμορφισμών AGT (CA)<sub>n</sub>, ACE I/D, REN (TCTG)<sub>n</sub> και NPRA (CT)<sub>n</sub> στην εμφάνιση ΣΝ***

Με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης των υπό εξέταση πολυμορφισμών με τη ΣΝ σε ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό OEM, υπολογίστηκαν οι σχετικοί κίνδυνοι (ΣΚ) ανά γονότυπο (**Πίνακας 15**). Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων των AGT, ACE και NPRA δε σχετίστηκαν με την παρουσία ΣΝ. Αντίθετα, ο πολυμορφισμός της REN ανέδειξε σημαντική συσχέτιση. Ο γονότυπος SL σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο ΣΝ (ΣΚ= 2.183, 95% ΔΕ: 1.352-3.526), ενώ οι ομοζυγώτες SS και LL εμφάνισαν μειωμένο κίνδυνο (ΣΚ= 0.554, 95% ΔΕ: 0.345-0.888 και ΣΚ= 0.234, 95% ΔΕ:0.055-0.996 αντίστοιχα). Πρέπει να σημειωθεί ότι μετά από διόρθωση των παραπάνω συσχετίσεων ως προς άλλους παράγοντες (ηλικία, BMI, αρτηριακή πίεση, λιπίδια ορού) η στατιστική σημαντικότητα δε διατηρήθηκε.

***Επίδραση των πολυμορφισμών AGT (CA)<sub>n</sub>, ACE I/D, REN (TCTG)<sub>n</sub> και NPRA (CT)<sub>n</sub> στη βαρύτητα της ΣΝ***

Με βάση τη στεφανιαία αγγειογραφία οι ομάδες  $\leq 1$ , 2 και 3αγγειακής ΣΝ περιελάμβαναν 47, 51 και 60 ασθενείς αντίστοιχα. Οι ομάδες αυτές δε διέφεραν σημαντικά σε καμία δημογραφική, κλινική ή εργαστηριακή παράμετρο ( $p < 0.05$ ). Με το υπολογισμό των σχετικών κινδύνων διερευνήθηκε η συσχέτιση των τεσσάρων πολυμορφισμών με την 3αγγειακή νόσο, τόσο μεταξύ των ασθενών, όσο και συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (**Πίνακας 16**). Ανάμεσα στους ασθενείς της ομάδας της ΣΝ παρουσιάστηκε μια συσχέτιση των SS και SL γονοτύπων και της παρουσίας 3αγγειακής ΣΝ. Συγκεκριμένα ο γονότυπος SS σχετίστηκε με αύξηση του σχετικού κινδύνου (ΣΚ 1.945, 95% ΔΕ 1.006-3.762), ενώ ο γονότυπος SL με μείωση αυτού (ΣΚ 0.449, 95% ΔΕ 0.218-0.923). Και μετά από διόρθωση ως προς άλλους παράγοντες κινδύνου (ηλικία, BMI, αρτηριακή πίεση, λιπίδια ορού) οι παραπάνω συσχετίσεις παρέμειναν σημαντικές. Παρομοίως, οι συσχετίσεις αυτές επαναλήφθηκαν και όταν έγινε σύγκριση της ομάδας της 3αγγειακής ΣΝ με την ομάδα ελέγχου.



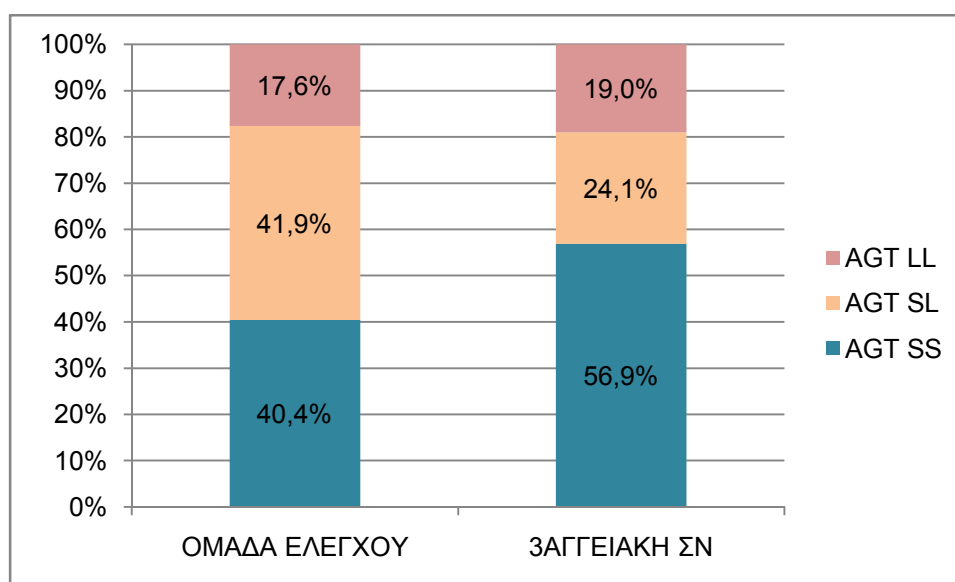
**Πίνακας 16. Σύσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών AGT (CA)<sub>n</sub>, ACE I/D, REN (TCTG)<sub>n</sub> και της έκτασης της ΣΝ. Σχετικές γονοτυπικές συχρότητες και σχετικός κίνδυνος για 3αγγειακή ΣΝ μεταξύ των ασθενών και σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου**

Γονότυπος	Σχετική συχρότητα γονοτύπων			ΣΚ (95% ΔΕ) για 3αγγειακή ΣΝ	
	≤1αγγειακή ΣΝ (n=47)	2αγγειακή ΣΝ (n=51)	3αγγειακή ΣΝ (n=60)	Μεταξύ των ασθενών	Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου
AGT SS	0.455	0.360	0.569	1.945 (1.006-3.762)*	1.944 (1.047-3.609)*
AGT SL	0.432	0.400	0.241	0.449 (0.218-0.923)*	0.441 (0.223-0.874)*
AGT LL	0.114	0.240	0.190	1.060 (0.464-2.426)	1.092 (0.502-2.382)
ACE DD	0.478	0.471	0.411	0.773 (0.399-1.497)	1.139 (0.556-1.942)
ACE ID	0.457	0.431	0.464	1.088 (0.564-2.099)	1.077 (0.586-1.980)
ACE II	0.065	0.098	0.125	1.589 (0.564-4.489)	0.669 (0.278-1.617)
REN SS	0.381	0.409	0.536	1.765 (0.897-3.472)	0.778 (0.418-1.449)
REN SL	0.595	0.591	0.446	0.553 (0.281-1.089)	1.529 (0.816-2.867)
REN LL	0.024	0.000	0.018	1.545 (0.158-15.104)	0.298 (0.047-1.896)
NPRA SS	0.300	0.240	0.190	0.647 (0.268-1.569)	0.929 (0.378-2.293)
NPRA SL	0.450	0.480	0.571	1.524 (0.733-3.168)	0.905 (0.435-1.878)
NPRA LL	0.250	0.280	0.238	0.859 (0.373-1.988)	1.234 (0.525-2.909)

AGT: αγγιοτενσινογόνο, ACE: μεταρρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης, REN: ρενίνη; NPRA: υποδοχέας Α του νατριουρητικού πεπτιδίου, S: βραχύ, L: μακρό, I: εισαγωγή, D: έλλειψη, \*p<0.05.

Έτσι, ο γονότυπος SS του γονιδίου του AGT ανέδειξε στατιστικά αυξημένο κίνδυνο για 3αγγειακή ΣΝ (ΣΚ= 1.944, 95% ΔΕ: 1.047-3.609) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ ο SL γονότυπος ήταν λιγότερο συχνός στην ομάδα της 3αγγειακής ΣΝ από ότι στην ομάδα ελέγχου (ΣΚ= 0.441, 95% ΔΕ: 0.223-0.874) (Γράφημα 4). Δεν ανιχνεύτηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών ACE I/D, REN (TCTG)η και NPRA (CT)η και του κινδύνου εμφάνισης 3αγγειακής ΣΝ, τόσο μεταξύ των ασθενών, όσο και συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

**Γράφημα 4. Συχνότητα γονοτύπων του (CA)η πολυμορφισμού του γονιδίου του AGT στην ομάδα 3αγγειακής ΣΝ και στην ομάδα ελέγχου**



#### **AGT (CA)η, ACE I/D, REN (TCTG)η και NPRA (CT)η πολυμορφισμοί και φλεγμονή**

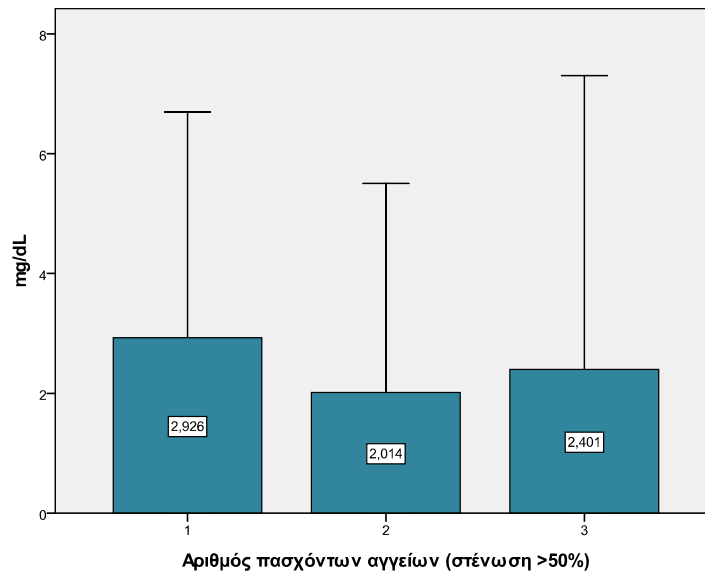
Οι συγκεντρώσεις της hsCRP δε σχετίστηκαν με τη βαρύτητα της ΣΝ. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ≤1, 2 και 3αγγειακής ΣΝ (Γράφημα 5). Επιπλέον, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις της hsCRP ανά γονότυπο στους τέσσερις πολυμορφισμούς της μελέτης στην ομάδα της ΣΝ (Πίνακας 17).

**Πίνακας 17. Κατανομή των τιμών της υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP) μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων των υπό εξέταση πολυμορφισμών στην ομάδα της ΣΝ**

Γονότυποι	hsCRP (mg/dL)	
AGT (CA)n		p=0.942
SS	2.30±4.47	
SL	2.56±4.16	
LL	2.46±3.46	
ACE I/D		p=0.511
II	3.65±4.92	
ID	2.38±3.02	
DD	2.27±5.00	
REN (TCTG)n		p=0.387
SS	1.96±2.65	
SL	2.95±5.32	
LL	1.60±0.28	
NPRA (CT)n		p=0.614
SS	2.92±5.29	
SL	1.87±2.23	
LL	2.07±3.43	

AGT: αγγειοτενσινογόνο, ACE: μεταρρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης, REN: ρενίνης, NPRA: υποδοχέας A του νατριουρητικού πεπτιδίου, S: βραχύ, L: μακρό, I: εισαγωγή, D: έλλειψη.

**Γράφημα 5. Συγκεντρώσεις υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP) στις ομάδες ≤1, 2 και 3 αγγειακής ΣΝ**



Οι μπάρες αναπαριστούν το μέσο όρο των τιμών + 1 σταθερά απόκλιση

**Ανάλυση παλινδρόμησης (logistic regression analysis)**

Με σκοπό τη διερεύνηση της συμβολής στην εμφάνιση ΣΝ των δύο πολυμορφισμών, οι οποίοι ανέδειξαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα στις προηγούμενες αναλύσεις, σχεδιάστηκαν δυο μοντέλα ανάλυσης παλινδρόμησης, ένα μονοπαραγοντικό και ένα πολυπαραγοντικό. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που εισήχθησαν στα μοντέλα ήταν ο γονότυπος του πολυμορφισμού του AGT (SS και SL), ο γονότυπος του πολυμορφισμού της REN (SS και SL) και όλες οι συνεχείς μεταβλητές που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την εμφάνιση και κλινική πορεία της ΣΝ (ηλικία, BMI, SBP, DBP, hsCRP, ολική χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, HDL, LDL). Οι κατηγορικές μεταβλητές που αντιπροσωπεύουν την παρουσία των κλασικών παραγόντων κινδύνου της ΣΝ (υπέρταση, κάπνισμα, υπερλιπιδαιμία, οικογενειακό ιστορικό ΣΝ) δε συμπεριελήφθησαν στα μοντέλα λόγω της εξαιρετικά μεγάλης διαφοράς επίπτωσης μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης. Στην μονοπαραγοντική ανάλυση στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις εμφανίστηκαν για τη DBP και τη

hsCRP, ενώ στο πολυπαραγοντικό μοντέλο με τη χρήση αντίστροφης ανάλυσης παρέμειναν η ηλικία, η DBP, η hsCRP, και η LDL, εμφανίζοντας μια θετική συσχέτιση με την εξαρτημένη μεταβλητή. Η αναλυτική παρουσίαση των δύο μοντέλων φαίνεται στον **πίνακα 18**.

**Πίνακας 18. Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση για την παρουσία ΣΝ**

	Beta	SE	Wald	ρ	Exp (B)
<b>Μονοπαραγοντική ανάλυση</b>					
AGT SS	0.442	0.736	0.358	0.550	1.554
AGT SL	-0.674	0.778	0.751	0.386	0.509
REN SS	1.518	1.360	1.246	0.264	4.561
REN SL	2.269	1.421	2.550	0.110	9.667
Ηλικία	0.051	0.029	3.129	0.077	1.053
BMI	-0.147	0.125	1.392	0.238	0.863
SBP	0.036	0.021	2.864	0.091	1.037
DBP	0.149	0.040	13.863	<0.001	1.161
hsCRP	0.481	0.221	4.742	0.029	1.618
Ολ. χοληστερόλη	-0.014	0.018	0.630	0.427	0.986
Τριγλυκερίδια	0.004	0.004	0.690	0.406	1.004
HDL	-0.021	0.029	0.535	0.465	0.979
LDL	0.037	0.021	3.272	0.070	1.038
<b>Πολυπαραγοντική ανάλυση</b>					
Ηλικία	0.056	0.027	4.380	0.038	1.057
DBP	0.151	0.031	24.292	<0.001	1.163
hsCRP	0.529	0.221	5.735	0.017	1.697
LDL	0.017	0.007	6.283	0.012	1.017
<i>Σταθερά</i>	-16.478	3.290	25.088	<0.001	<0.001

AGT: αγγειοτενσινογόνο, REN: ρενίνη, SBP: συστολική αρτηριακή πίεση, DBP: διαστολική αρτηριακή πίεση, BMI: δείκτης μάζας σώματος, hsCRP: υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, LDL: χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, S: βραχύ, L: μακρό, SE: σταθερό σφάλμα.

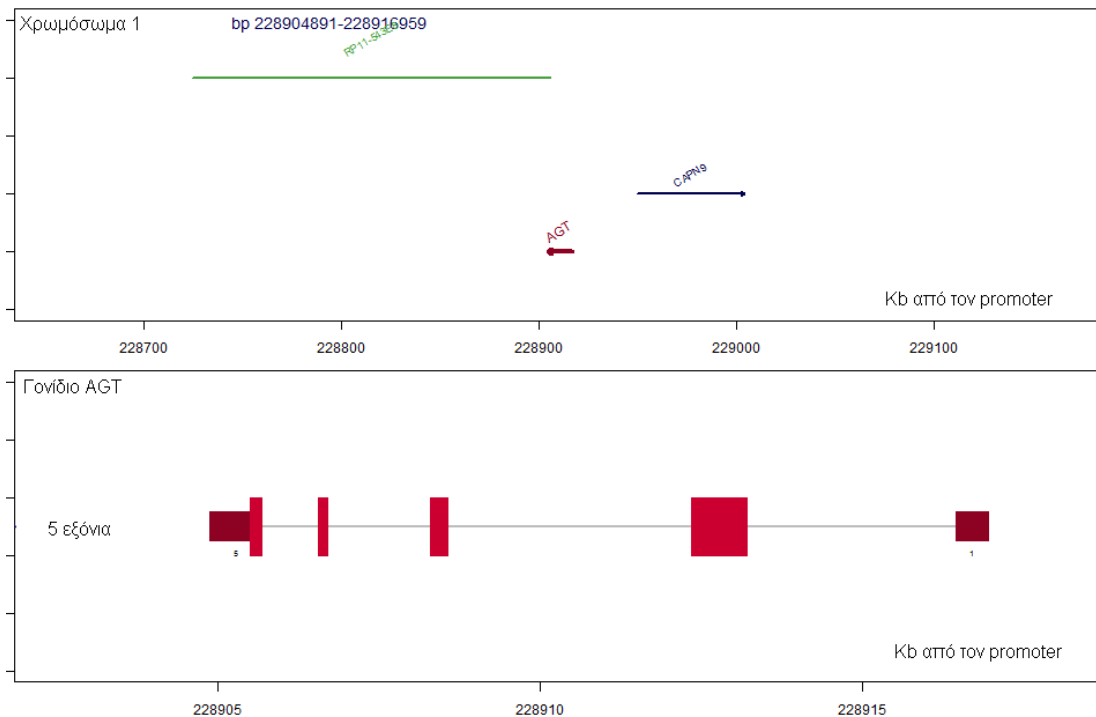
#### IV. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, που διενεργήθηκε σε ομοιογενή πληθυσμό της Κεντρικής Ελλάδας πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση συσχέτισης της ΣΝ σε ασθενείς με ιστορικό προσφάτου OEM και πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες των ΣΡΑΑ και ΣΝΠ. Για πρώτη φορά εμφανίστηκε μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του (CA)n πολυμορφισμού του γονιδίου του AGT με την έκταση της ΣΝ και πιο συγκεκριμένα με την παρουσία Ζαγγειακής νόσου. Η συσχέτιση αυτή αναδείχθηκε τόσο μεταξύ των ασθενών όσο και σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, ο (TCTG)n πολυμορφισμός του γονιδίου της REN σχετίστηκε με την παρουσία ΣΝ, αν και η διόρθωση ως προς τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου προκάλεσε απώλεια της στατιστικής σημαντικότητας. Δεν παρουσιάστηκαν άλλες σημαντικές συσχετίσεις των υπο εξέταση πολυμορφισμών σε ότι αφορά τον κίνδυνο ΣΝ ή τη βαρύτητα αυτής, καθώς και σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της hsCRP.

#### **Αγγειοτενσινογόνο (AGT)**

Ανάμεσα στα υποψήφια γονίδια του ΣΡΑΑ, το γονίδιο του AGT ήταν το πρώτο που αναγνωρίστηκε και μελετήθηκε ενδελεχώς σε σχέση με τις καρδιαγγειακές παθήσεις.<sup>349</sup> Το ανθρώπινο γονίδιο του AGT, ένα μέλος της υπεροικογένειας του γονιδίου της σερπίνης, εκτείνεται σε μόλις 12kb στο χρωμόσωμα 1 (1q42-q43) και περιέχει 5 εξόνια<sup>350</sup> (εικόνα 10). Έχει απομονωθεί τόσο σε σπονδυλωτούς όσο και σε ασπόνδυλους οργανισμούς.<sup>351</sup> Δύο σημαντικές περιοχές του γονιδίου περιλαμβάνουν τον προαγωγέα, που εντοπίζεται μόλις 1.2kb άνωθεν του πρώτου εξονίου και τον ενισχυτή, που βρίσκεται αμέσως κάτω από τη δεύτερη πολυαδενυλική θέση στην 3' ανοδική περιοχή.<sup>352</sup> Παρόλο που ο ενισχυτής αυτός προκαλεί αύξηση κατά 40 φορές της έκφρασης του γονιδίου, η in vivo αξία του έχει αμφισβητηθεί.<sup>353</sup> Το παράγωγο του γονιδίου είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 485 αμινοξέων (61kDa) που περιέχει ένα σηματοδοτικό πεπτιδίο το οποίο αφαιρείται για παραχθεί το 452 αμινοξέων τελικό προϊόν.

## Εικόνα 10. Εντόπιση του γονιδίου του AGT στο χρωμόσωμα 1 και απεικόνιση των βασικών γενετικών του δομών



Το AGT εκφράζεται σε διάφορους ιστούς όπως τα επιθηλιακά κύτταρα στο νεφρικό εγγύς σωληνάριο, τα ηπατοκύτταρα στο ήπαρ, τα λιποκύτταρα στο λίπος και τα αστροκύτταρα και εξειδικευμένοι νευρώνες στον εγκέφαλο. Παρόλο που φαίνεται ότι τα παραγωγά κύτταρα απελευθερώνουν το σύνολο των μορίων AGT, υπάρχουν και νεότερα δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι μόρια πρωτεΐνης παραμένουν στον πυρήνα κάποιων κυττάρων.<sup>354</sup> Η μόνη γνωστή λειτουργία του AGT είναι το ότι αποτελεί την πρώτη ύλη επίδρασης της ρενίνης προς παραγωγή αγγειοτενσίνης I. Τα N-τελικά αμινοξέα των ώριμων μορίων AGT απομακρύνονται ενδαγγειακά αρχικά από τη ρενίνη που παράγεται από τα παρασπειραματικά κύτταρα, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία του δεκαπεπτιδίου της αγγειοτενσίνης I. Το υπόλοιπο του μορίου του AGT μετά την επίδραση της ρενίνης δε φαίνεται να παίζει κάποιο φυσιολογικό ρόλο.

Η αντίδραση μεταξύ ρενίνης και AGT είναι βασικής σημασίας στην ενεργοποίηση όλου του ΣΡΑΑ. Μικρές μεταβολές στις συγκεντρώσεις είτε του AGT είτε της ρενίνης μεταβάλλουν αντίστοιχα την παραγωγή της αγγειοτενσίνης και μπορούν να μεταβάλλουν την αρτηριακή πίεση.<sup>355</sup> Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό καθώς πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει μεταλλάξεις του γονιδίου με τα επίπεδα του



AGT στο πλάσμα. Έχει βρεθεί ότι η αύξηση των αντιγράφων του γονιδίου του AGT επηρεάζει τις συγκεντρώσεις του στο πλάσμα, καθώς και την αρτηριακή πίεση (αύξηση κατά 7mmHg περίπου).<sup>356</sup> Σε μοντέλα ζώων όπου υπερεκφράζεται το γονίδιο του AGT παρατηρείται πολύ αυξημένη αρτηριακή πίεση, καθώς και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, καρδιακή υπερτροφία και νεφρικές ανωμαλίες.<sup>357, 358</sup>

Το γονίδιο του AGT έχει διερευνηθεί σε μελέτες ασθενών με ΣΝ. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του AGT είναι αρκετοί σε αριθμό, αλλά σχετικά σπάνιοι. Η αντικατάσταση της μεθειονίνης από θρεονίνη στο αμινοξύ 235 (M235T), ένας κοινός πολυμορφισμός στους Καυκάσιους, και η μετάλλαξη από θρεονίνη σε μεθειονίνη στο αμινοξύ 174 (T174M) είναι οι δύο καλύτερα μελετημένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου του AGT. Ο M235T πολυμορφισμός έχει συσχετισθεί με τη συγκέντρωση του AGT στο πλάσμα και τους ιστούς, όπου το AGT είναι υπεύθυνο για τη διαμόρφωση των επιπέδων αγγειοτενσίνης II.<sup>349</sup> Το αλληλίο T235 θεωρείται ότι επίσης αυξάνει τα επίπεδα AGT στο πλάσμα<sup>359</sup> και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ΣΝ και OEM.<sup>360, 361</sup> Επιπλέον, αυξάνει τον κίνδυνο για ΣΝ σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία.<sup>362</sup> Μια μεγάλη μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 43 μελέτες συσχέτισης με περισσότερους από 13000 στεφανιαίους ασθενείς έδειξε μια γενική τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού M235T και του κινδύνου για ΣΝ (ΣΚ=1.11, 95% ΔΕ: 1.03-1.19).<sup>363</sup> Ωστόσο, η συσχέτιση αυτή εμφανίστηκε πιο συχνά στις μικρότερες σε πληθυσμό ασθενών μελέτες της μετα-ανάλυσης και όχι στις μεγαλύτερες, γεγονός θέτει υπό αμφισβήτηση τη στατιστική σημαντικότητα του σχετικού κινδύνου, καθώς αυτή βασίζεται σε χαμηλής ισχύος αποτελέσματα. Ο TT γονότυπος του κωδονίου 174 του γονιδίου του AGT έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας κινδύνου για ΣΝ σε άτομα με μειωμένο BMI, με μικρό αριθμό συνυπαρχόντων παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου ή με γονότυπο II στον I/D πολυμορφισμό του γονιδίου του ACE.<sup>364</sup>

Σε ότι αφορά τη βαρύτητα της ΣΝ υπάρχουν παλαιότερες αναφορές που περιλαμβάνουν πολυμορφισμούς του AGT γονιδίου. Σε μία από αυτές οι πολυμορφισμοί του AGT σχετίστηκαν με τη ΣΝ σε άτομα μικρότερα των 62 ετών.<sup>365</sup> Επίσης, ο TT γονότυπος του M235T πολυμορφισμού έχει βρεθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης πολυαγγειακής ΣΝ,<sup>366</sup> ανεξάρτητα από άλλους καρδιαγγειακούς παράγοντες που σχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου.<sup>367</sup> Ωστόσο, υπάρχουν και αναφορές που δεν υποστηρίζουν τα ευρήματα αυτά, γεγονός που καθιστά τη συσχέτιση του M235T πολυμορφισμού με την έκταση της ΣΝ αμφίβολη.<sup>368</sup>

Ο (CA)n πολυμορφισμός, ο οποίος περιλαμβάνεται στην παρούσα μελέτη, δεν έχει διερευνηθεί στο παρελθόν σε στεφανιαίους ασθενείς. Ωστόσο, σε μια μελέτη συσχέτισης με την υπέρταση, ορισμένα αλληλία του (CA)n πολυμορφισμού εμφάνισαν ισχυρή σύνδεση (linkage disequilibrium) με τους δυαλληλικούς πολυμορφισμούς M235T και T174M, με παρόμοιο τρόπο και στους δύο υπό εξέταση πληθυσμούς.<sup>369</sup>

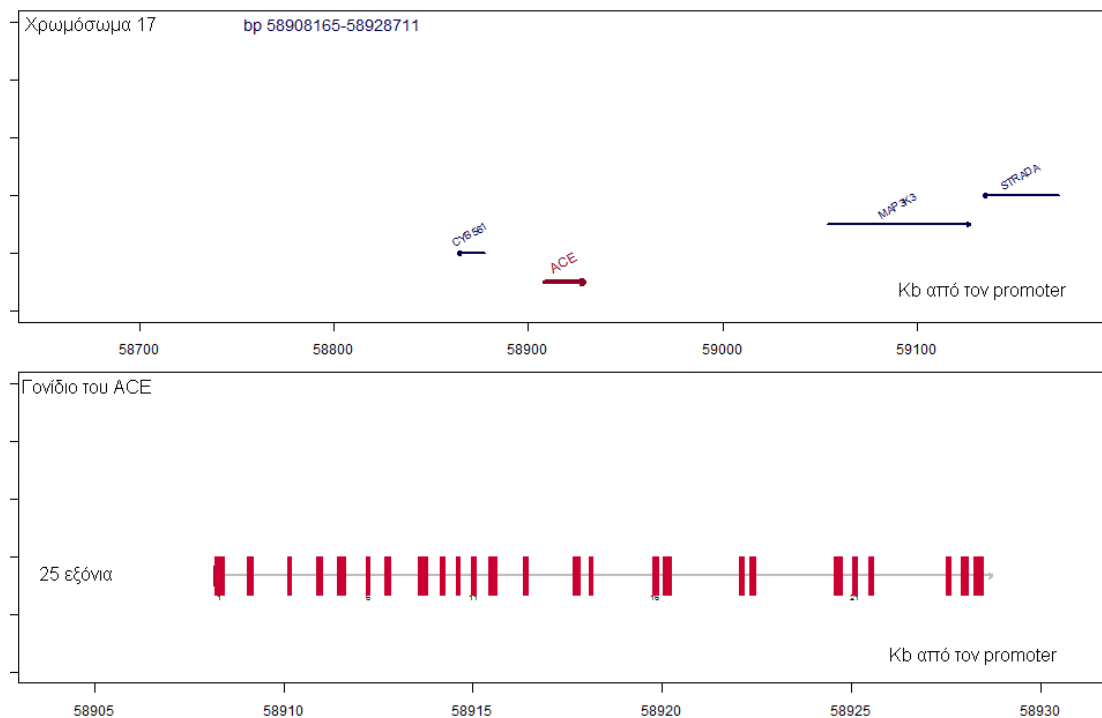
Στην παρούσα μελέτη δεν εμφανίστηκε σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων του AGT (CA)n μεταξύ της ομάδας της ΣΝ και της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο, η εμφάνιση της σημαντικής συσχέτισης του πολυμορφισμού με την παρουσία Ζαγγειακής ΣΝ, τόσο μεταξύ των ασθενών, όσο και σε σύγκριση με τους υγιείς, η οποία εμφανίζεται για πρώτη φορά, είναι μια ακόμα απόδειξη της αλληλεπίδρασης του γονιδίου του AGT και της ΣΝ. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει το συμπέρασμα ότι η παρουσία του SS γονοτύπου σε ένα άτομο που πάσχει από στεφανιαία νόσο είναι δείκτης αυξημένου κινδύνου για εκτεταμένη νόσο (Ζαγγειακή) και θα πρέπει να λαμβάνεται αυτό υπόψη κατά τη διαγνωστική και θεραπευτική του προσέγγιση. Απαιτούνται μεγαλύτερες μελέτες για την αξιολόγηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών του γονιδίου του AGT και της ΣΝ, καθώς δεν είναι απίθανο κάποια στιγμή στο μέλλον να υπάρξει η δυνατότητα αναστολής αυτού φαρμακευτικά, οπότε η εξατομίκευση της θεραπείας σε ασθενείς υψηλού κινδύνου να μπορεί να επιφέρει στοχευμένα καλά αποτελέσματα.

### **Μετατρεπτικό Ένζυμο της Αγγειοτενσίνης (ACE)**

Το ACE παίζει σημαντικό ρόλο στο ΣΡΑΑ, καθώς αποτελεί το κύριο ένζυμο παραγωγής της αγγειοτενσίνης II. Εμφανίζεται κατά κύριο λόγο ως γλυκοπρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Το υδρόφοβο καρβοξυτελικό άκρο του έρχεται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη, ενώ οι δύο καταλυτικές περιοχές βρίσκονται στην εξωκυττάρια πλευρά. Οι περιοχές αυτές έχουν ανεξάρτητη δράση, απαιτούν ψευδάργυρο για τη δράση τους, ενεργοποιούνται από το χλώριο και είναι ευαίσθητες στους AMEA. Το ένζυμο απελευθερώνεται μετά από ενζυμική διάσπαση που επισυμβαίνει είτε ενδοκυττάρια είτε στην πλασματική μεμβράνη. Το μόριο του ACE φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 1270 και ενεργοποιεί μηχανισμό αυξημένης σύνθεσης αγγειοτενσίνης II και αύξησης της κυκλοξυγενάσης-2. Η μεταβολική αυτή δράση έχει εντοπιστεί στο λιπώδη ιστό.<sup>55</sup> Παρόλα αυτά ο ρόλος του ACE δεν περιορίζεται στην παραγωγή αγγειοτενσίνης. Έχει επιβεβαιωθεί και η ορμονική του δράση υπο την επίδραση αναστολέων του ACE και της βραδικινίνης.<sup>55</sup>

Το γονίδιο του ACE εντοπίζεται στην περιοχή 17q23 και αποτελείται από 25 εξόνια και 24 ιντρόνια συνολικού μήκους 4195 bp (**Εικόνα 11**).<sup>370</sup> Έχουν αναγνωριστεί δύο ομόλογες περιοχές του γονιδίου με βαθμό ταυτοσημίας >60% στις περιοχές 700-1770 και 2495-3565. Οι δύο ομόλογες περιοχές θεωρούνται οι καταλυτικές θέσεις του ενζύμου.<sup>371</sup> Το μήκος του μεταγράφου έχει μέγεθος 4.3 kb και μοριακό βάρος 150-180 kDa. Διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου του ACE έχει μελετηθεί ως προς την αιτιολογική συσχέτιση που μπορεί να έχει με πλήθος παθολογικών καταστάσεων όπως η υπέρταση, η ΣΝ, η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια και η διαβητική νεφροπάθεια.

### Εικόνα 11. Εντόπιση του γονιδίου του ACE στο χρωμόσωμα 17 και απεικόνιση των βασικών γενετικών του δομών



Ο πολυμορφισμός που εμφανίζεται στο εσόνιο 16 του γονιδίου του ACE με τη μορφή της προσθήκης/έλλειψης (insertion/deletion-I/D) μιας αλληλουχίας 287 bp, επιδρά στις περιφερικές συγκεντρώσεις του ενζύμου. Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα και στους ιστούς του ACE είναι δύο έως τρεις φορές υψηλότερες σε άτομα με γονότυπο DD σε σύγκριση με το γονότυπο II, ενώ άτομα με γονότυπο ID παρουσιάζουν ενδιάμεσες τιμές επιπέδων του ενζύμου στο πλάσμα και τους ιστούς.<sup>372, 373</sup> Η συσχέτιση του πολυμορφισμού αυτού με τη ΣΝ σε ασθενείς με ή χωρίς προηγούμενο ιστορικό OEM είναι αμφίβολη, καθώς οι διάφορες μελέτες συσχέτισης

ανέδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ενώ διάφορες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η παρουσία του DD γονοτύπου ή του D αλληλίου αποτελούν παράγοντα κινδύνου για ΣΝ<sup>374, 375</sup> και OEM,<sup>376-379</sup> άλλες αναφορές δεν κατόρθωσαν να επιβεβαιώσουν μια τέτοια συσχέτιση τόσο σε ότι αφορά τη ΣΝ<sup>380</sup> όσο και το OEM<sup>381, 382</sup> ακόμα και σε χαμηλού κινδύνου ασθενείς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μεγάλης μετα-ανάλυσης ο DD γονότυπος του I/D πολυμορφισμού του γονιδίου του ACE φαίνεται να είναι ένας ασθενής παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ΣΝ, με την υποσημείωση ότι ίσως υπάρχει μια τάση θετικοποίησης της συσχέτισης αυτής περισσότερο στις μικρές μελέτες από ότι στις μεγαλύτερες.<sup>383</sup> Επιπλέον, και οι μελέτες που περιλαμβάνουν αγγειογραφική επαλήθευση της παρουσίας της ΣΝ δεν ανέδειξαν παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με τη συσχέτιση του I/D πολυμορφισμού με τη βαρύτητα της ΣΝ,<sup>384, 385</sup> ενώ δεν εμφανίστηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού ούτε και με την ποσότητα ασβεστίου των στεφανιαίων αγγείων, ενός αναγνωρισμένου δείκτη στεφανιαίας αθηρωμάτωσης.<sup>386</sup> Με τα μέχρι τώρα γνωστά δεδομένα δεν έχει διενεργηθεί άλλη Ελληνική μελέτη συσχέτισης του I/D πολυμορφισμού του γονιδίου του ACE με την παρουσία και την έκταση της ΣΝ σε ασθενείς με ιστορικό OEM. Αντίθετα, υπάρχουν αναφορές που αφορούν τη συσχέτισή του με την υπέρταση.<sup>387</sup>

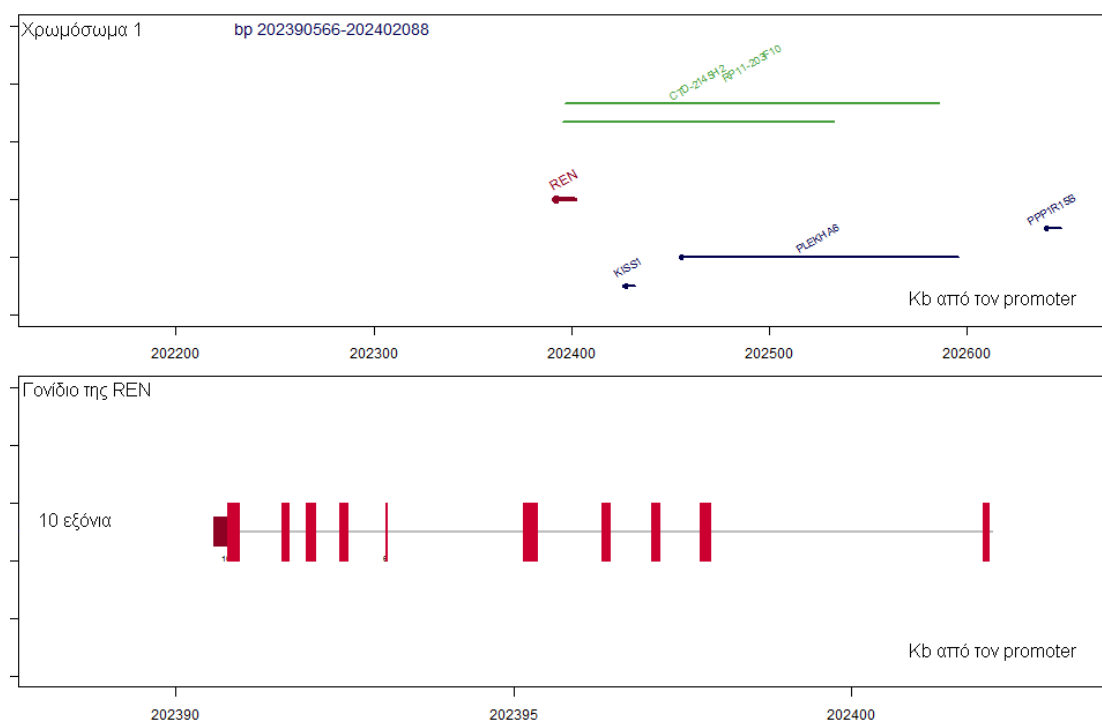
Στην παρούσα μελέτη το D αλληλίο, ο DD και ο ID γονότυπος εμφανίστηκαν πιο συχνά στην ομάδα της ΣΝ, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την παγκοσμίως αναγνωρισμένη τάση, αλλά οι διαφορές στην επίπτωση δεν άγγιξαν τη στατιστική σημαντικότητα. Τελικά, στον πληθυσμό της παρούσας μελέτης ο I/D πολυμορφισμός του ACE δε σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο ΣΝ σε ασθενείς με ιστορικό OEM. Επίσης, δεν αναγνωρίστηκε συσχέτιση με τον αριθμό των σημαντικά στενωμένων αγγείων ή με τις συγκεντρώσεις της hsCRP.

### ***Ρενίνη (REN)***

Η REN, μια συστηματική ασπартική πρωτεάση, φαίνεται ότι κατέχει μια μοναδική ιδιότητα και σημαντική λειτουργία: τη μετατροπή του AGT σε αγγειοτενσίνη I. Το γονίδιο της εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (1q32) και περιέχει 10 εξόνια που επεκτείνονται σε 12kb (**εικόνα 12**). Το mRNA που προέρχεται από τη μετάφραση του γονιδίου έχει μέγεθος περίπου 1500bp και η παραγόμενη πρωτεΐνη αποτελείται από 406 αμινοξέα. Η ανεύρεση των υποδοχέων της προρενίνης κατέστησε τη ουσία αυτή σημαντική και στο μεταβολικό πεδίο, αφαιρώντας της τον αποκλειστικά μεσολαβητικό της ρόλο.<sup>388</sup> Έχει επιβεβαιωθεί ότι η κύρια πηγή (προ)ρενίνης για το διάμεσο ιστό του

μυοκαρδίου είναι η πρόσληψη (προ)ρενίνης από την κυκλοφορία.<sup>389, 390</sup> Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η ιστική προρενίνη είναι μεταβολικά ενεργή<sup>86, 87</sup> και ότι η ρενίνη καθεαυτή έχει επιδράσεις στο κύτταρο ανεξάρτητες από την παραγωγή αγγειοτενσίνης II.<sup>57, 388</sup> Η πρόσληψη ρενίνης από την περιφέρεια και η αυξημένη δραστηριότητα αυτής στην κυτταρική επιφάνεια αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό του ιστικού ΣΡΑΑ, στο οποίο οι υποδοχείς της ρενίνης παίζουν σημαντικό ρόλο.

### Εικόνα 12. Εντόπιση του γονιδίου της REN στο χρωμόσωμα 1 και απεικόνιση των βασικών γενετικών του δομών



Σε μελέτες με ανθρώπους, σε ότι αφορά το καρδιαγγειακό σύστημα, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της REN έχουν διερευνηθεί μόνο στο πεδίο της αρτηριακής υπέρτασης. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί μια θετική συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών της REN και υπέρτασης.<sup>391, 392</sup> Η σημασία του (TCTG)<sub>n</sub> πολυμορφισμού επανάληψης του εσονίου 7 του γονιδίου της REN έχει διερευνηθεί σε πληθυσμό από την Ιαπωνία, όπου και δεν επιβεβαιώθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της κατανομής των γονοτύπων και της αρτηριακής υπέρτασης.<sup>393</sup>

Στην παρούσα μελέτη ο εν λόγω πολυμορφισμός σχετίστηκε σημαντικά με τον κίνδυνο για ΣΝ. Ειδικά, ο SL γονότυπος εμφάνισε αυξημένο κίνδυνο, ενώ οι

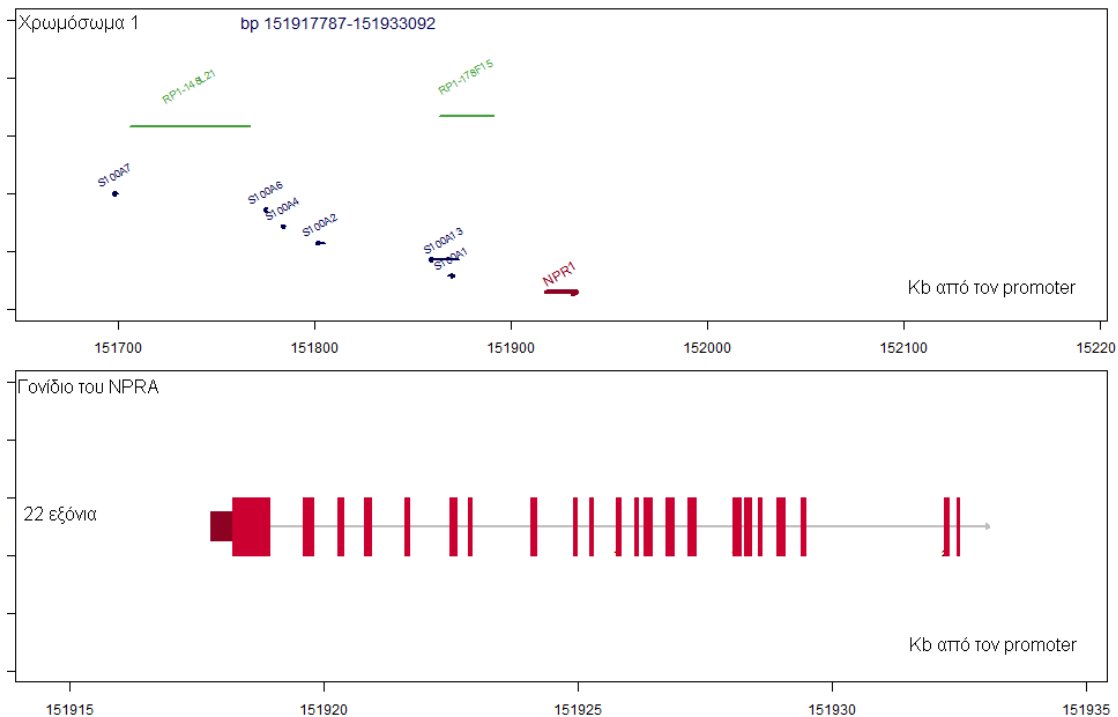
ομοζυγώτες SS και LL ανέδειξαν μειωμένο κίνδυνο για ΣΝ. Μετά από διόρθωση ως προς τους συνυπάρχοντες παράγοντες κινδύνου, οι προαναφερόμενες συσχετίσεις δε διατηρήθηκαν. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση του πολυμορφισμού στην έκταση της ΣΝ. Από παλαιότερη μελέτη μας γνωρίζουμε ότι ο γονότυπος του (TCTG)η πολυμορφισμού του γονιδίου της REN συνδέεται με την εμφάνιση αρτηριακής υπέρτασης στον Ελληνικό πληθυσμό.<sup>394</sup> Έτσι, η πολύ μεγαλύτερη επίπτωση της υπέρτασης στην ομάδα της ΣΝ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου θα μπορούσε εν μέρει να εξηγήσει τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

### **Υποδοχέας A των νατριουρητικών πεπτιδίων (NPRA)**

Το γονίδιο του NPRA εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1q21-22 και έχει παρόμοια δομή με αυτό του NPRB, που εντοπίζεται στο 9p21-p12 χρωμόσωμα.<sup>160, 395</sup> Τα γονίδια αυτά έχουν μήκος 16kb και είναι κατά 64% ομόλογα ως προς το cDNA.<sup>395</sup> Και τα δύο αποτελούνται από 22 εξόνια.<sup>395</sup> (εικόνα 13). Έχουν βρεθεί διάφορες θέσεις πολυμορφισμού στο γονίδιο του NPRA, ειδικά στην 5' ανοδική περιοχή και σε άλλες μη μεταφράσιμες περιοχές, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ισχύ της μετάφρασης του γονιδίου, και με αυτόν τον τρόπο πιθανόν να εμπλακούν στην παθογένεση της υπέρτασης και άλλων καρδιαγγειακών νοσημάτων.<sup>169, 396-404</sup>

Διάφορες λειτουργικές αναλύσεις έδειξαν ότι κοινοί απλότυποι που φέρουν τους παραπάνω πολυμορφισμούς μπορούν να επηρεάσουν το βαθμό ενεργοποίησης του γονιδίου του NPRA έως και στο διπλάσιο. Η έλλειψη 8bp στην ανοδική περιοχή του γονιδίου έχει συσχετιστεί με την υπέρταση και την υπερτροφία της αριστερής κοιλίας σε μελέτη που διενεργήθηκε σε Ιαπωνικό πληθυσμό.<sup>398</sup> Σε μια άλλη μελέτη των ίδιων ερευνητών μια παρανοσηματική μετάλλαξη, η M341I, που μεταφράζεται σε αντικατάσταση της μεθειονίνης από ισολευκίνη στο νουκλεοτίδιο 1023 του εξονίου 3, συσχετίστηκε επίσης με την υπέρταση.<sup>399</sup> Η αμινική θέση 341 βρίσκεται στην καμπή μεταξύ 2 α-ελίκων, ώστε ο πολυμορφισμός M341I να επηρεάζει τη μορφολογία του υδρόφοβου πυρήνα του υποδοχέα, επηρεάζοντας τη δραστηριότητά του.<sup>399</sup> Επιπλέον, ο ίδιος πολυμορφισμός βρέθηκε ότι συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο OEM στους Ιάπωνες.<sup>400</sup> Η έλλειψη 8bp στην ανοδική περιοχή του NPRA διερευνήθηκε και σε πληθυσμό της Ιταλίας, όπου βρέθηκε ότι σχετίζεται με το δείκτη μάζας της αριστερής κοιλίας και το πάχος του μεσοκοιλιακού διαφράγματος, γεγονός που υπονοεί ότι ο λειτουργικός αντίκτυπος του μεταλλαγμένου γονιδίου είναι η μείωση της δραστηριότητας του A υποδοχέα.<sup>405</sup>

### Εικόνα 13. Εντόπιση του γονιδίου του NPRA στο χρωμόσωμα 1 και απεικόνιση των βασικών γενετικών του δομών



Πρόσφατα έγινε προσδιορισμός της αλληλουχίας (sequencing) όλου του γονιδίου του NPRA και αναγνωρίστηκε η (CT)η δινουκλεοτιδική επαναληπτική περιοχή στο νουκλεοτίδιο -293 στην περιοχή του promoter, καθώς και 9 ακόμη θέσεις πολυμορφισμού στη μη-κωδικοποιήσιμη περιοχή του γονιδίου.<sup>402</sup> Συγκεκριμένα βρέθηκαν 3 κοινοί απλότυποι στις 5' και 3' περιοχές του γονιδίου, ενώ 3 από αυτές φάνηκε ότι έχουν ποσοτική επίδραση στην έκφραση του υποδοχέα *in vitro*.<sup>402</sup> Οι απλότυποι του γονιδίου NPRA αξιολογήθηκαν σε 402 λευκούς ενήλικες, ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα και καρδιακή ανεπάρκεια και υγιείς εθελοντές.<sup>403</sup> Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο απλότυπος -4 σχετίζεται με υψηλά επίπεδα NT-προBNP και αποτελεί ένα γενετικό προβλεπτικό παράγοντα διακύμανσης του BNP στους υγιείς ενήλικες, αλλά όχι στους καρδιολογικούς ασθενείς.

Ο (CT)η πολυμορφισμός στην 5' ανοδική περιοχή του γονιδίου βρέθηκε επίσης ότι συσχετίζεται με την υπέρταση, πιθανόν μέσω ρύθμισης προς τα κάτω της μετάφρασης του γονιδίου του υποδοχέα,<sup>404</sup> αν και άλλες αναφορές δεν επιβεβαίωσαν αυτή τη συσχέτιση.<sup>397</sup> Επιπλέον, το γεγονός ότι σε υπερτασικούς ασθενείς που έφεραν αλλήλια αυτού του πολυμορφισμού αναδείχθηκε μια συσχέτιση με το δείκτη μάζας της αριστερής κοιλίας, δείχνει ότι πολυμορφικά αλλήλια του γονιδίου πιθανόν

να σχετίζονται με μειωμένη δραστηριότητα του NPRA.<sup>405</sup> Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της υπέρτασης με την έλλειψη 8kb στην 5' UTR.<sup>404</sup> Στην παρούσα μελέτη δεν αναδείχθηκε συσχέτιση του (CT)η πολυμορφισμού του γονιδίου του NPRA και της ΣΝ. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δε σχετίστηκε με την έκταση της ΣΝ.

### ***C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)***

Η CRP δεν αποθηκεύεται αλλά απελευθερώνεται όπως ακριβώς έχει συντεθεί με μια σταθερή τιμή κάθαρσης από το πλάσμα. Η κύρια εστία ρύθμισης των συγκεντρώσεων του πλάσματος φαίνεται να εντοπίζεται στο επίπεδο της μετάφρασης του γονιδίου.<sup>406</sup> Έχει αναφερθεί ότι διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου της CRP επηρεάζουν τα επίπεδα αυτής στην ηρεμία και μετά από φλεγμονώδες ερέθισμα (**πίνακας 19**).<sup>407</sup>

Η διακύμανση των τιμών της CRP ως αποτέλεσμα του γονοτύπου του γονιδίου της δίνει τη δυνατότητα αντικειμενικότερης μελέτης της επίδρασης της CRP σε κλινικά τελικά σημεία, καθώς η μελέτη με βάση τους πολυμορφισμούς απαιτεί μικρότερο βαθμό διόρθωσης με βάση συμπαραγόντες κινδύνου.<sup>408, 409</sup> Η κατοχή ενός γονοτύπου ή απλοτύπου χαμηλής CRP κατά τη γέννηση είναι ανάλογη με την υποτιθέμενη τυχαιοποίηση σε ένα ειδικό φάρμακο μείωσης της CRP σε μια κλινική μελέτη. Επιπλέον, καθώς ο γονότυπος είναι καθορισμένος και ανεπηρέαστος από συνυπάρχουσες νόσους, οι γενετικές συσχετίσεις δεν έχουν τον κίνδυνο ανάστροφης αιτιολογίας. Με βάση τα παραπάνω έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες ανίχνευσης της επίδρασης της CRP στην ΣΝ<sup>409</sup> ή στην ΑΠ<sup>410</sup> και το μεταβολικό σύνδρομο<sup>223</sup> με τις ομάδες των μελετών να διαχωρίζονται με βάση έναν μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό της 3' περιοχής του γονιδίου της CRP. Οι αναλύσεις αυτές απέδειξαν ότι ο εν λόγω πολυμορφισμός επηρεάζει τις συγκεντρώσεις της CRP και ότι οι περισσότεροι από τους συμπαραγόντες κατανέμονται όμοια μεταξύ των γονοτυπικών ομάδων. Συνολικά υπάρχουν 12 κοινοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (με συχνότητα του υπολειπόμενου αλληλίου >5%) στους Ευρωπαίους και 22 σε Αφρικανούς σε μια περιοχή 6kb που κωδικοποιεί το γονίδιο. Στους Ευρωπαίους οι 12 πολυμορφισμοί κατανέμονται μεταξύ μόλις 4 απλότυπων και αντιστοιχούν στο 95% των χρωμοσωμάτων.<sup>223, 411-413</sup> Μια ανάλυση 25 μελετών με περίπου 31000 συμμετέχοντες από την Ευρώπη έδειξε μια διαφορά 0.12-0.96mg/L ανά αλληλίο, ανάλογα με το υπό μελέτη πολυμορφισμό. Διάφορες αρχικές μελέτες έδειξαν ότι παρόλο που οι ξεχωριστοί γονότυποι σχετίζονται ξεκάθαρα με τα επίπεδα CRP, δεν



έχουν κάποια σχέση με οποιονδήποτε άλλο δείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου γεγονός που τους καθιστά ιδανικούς για διενέργεια Μενδέλειων τυχαιοποιήσεων.<sup>223, 409, 412, 414, 415</sup>

### Πίνακας 19. Επίπεδα συγκεντρώσεων της CRP ως προς πολυμορφισμούς του γονιδίου της

Πολυμορφισμός	Αριθμός μελετών (συμμετέχοντες)	Σχετική επίδραση στις τιμές της CRP (κλασική μεταανάλυση)*	Σχετική επίδραση στις τιμές της CRP (Bayesian μοντέλο)*
rs1800947 (+1059G→C)	10 (11045)	-0.38 (-0.50, -0.25)	-0.26 (-0.46, -0.11)
rs1205 (+2302G→A)	10 (16 942)	-0.35 (-0.41, -0.28)	-52 (-0.68, -0.36)
rs1417938 (+194A→T)	5 (7460)	0.17 (0.03, 0.31)	-
rs2794521 (-717A→G)	6 (5803)	0.12 (-0.10, 0.35)	-
rs1130864 (+1444C→T)	19 (21 674)	0.19 (0.14, 0.25)	-0.34 (0.20, -1.17)
rs3091244 (-286C→T/A)	7 (7786)	0.20 (0.15, 0.25)	-
rs3093077 (+4899T→G)	4 (6619)	0.48 (0.33, 0.62)	0.59 (0.37, 0.95)
rs3093059 (-757T→C)	3 (3475)	0.58 (0.37, 0.78)	-

\*Η επίδραση αναφέρεται ως σχετική τιμή (95% διάστημα εμπιστοσύνης)

Σε διάφορες μελέτες συσχέτισης αναζητήθηκε η επίδραση των πολυμορφισμών του γονιδίου της CRP σε καρδιαγγειακές παθήσεις. Η επανάληψη GT στο εσόνιο του γονιδίου συνδέθηκε με τον κίνδυνο αγγειακών συμβαμάτων,<sup>416</sup> ενώ ο πολυμορφισμός +29A/T δε σχετίστηκε με την επαναστένωση.<sup>417</sup> Ο πολυμορφισμός +1059G/C έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την ταχύτητα του σφυγμικού κύματος,<sup>418</sup> αλλά όχι με την αρτηριακή θρόμβωση<sup>419</sup> και την αρτηριακή πίεση.<sup>410</sup> Στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου βρίσκεται ο τριαλληλικός πολυμορφισμός -390C/T/A, ο οποίος συνδέθηκε πρόσφατα με τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων.<sup>420</sup> Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί του προαγωγέα εμφανίζουν καλή συσχέτιση με τις καρδιακές παθήσεις, το σακχαρώδη διαβήτη και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Έχουν αναγνωριστεί και φυλετικές ιδιαιτερότητες αναφορικά με την επίδραση των πολυμορφισμών του γονιδίου της CRP στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Πιο συγκεκριμένα, στους Καυκάσιους ο +29A/T πολυμορφισμός σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και καρδιαγγειακής θνητότητας, ενώ οι +1059G/C και +1846C/T πολυμορφισμοί μόνο με την καρδιαγγειακή θνητότητα. Στους Αφροαμερικανούς ο 757T/C πολυμορφισμός σχετίστηκε με το OEM. Οι παραπάνω μελέτες δεν είχαν την απαραίτητη ισχύ για την ανίχνευση μιας μεταβολής 10-20% στο συνολικό κίνδυνο. Υπολογίζεται ότι απαιτούνται τουλάχιστον 15000 συμβάματα και παρόμοιος αριθμός υγιών για να υπολογιστεί ασφαλώς ο ακριβής κίνδυνος.

Τα επίπεδα της CPR και κατ' επέκταση της φλεγμονώδους αντίδρασης έχουν συσχετισθεί και με γονίδια που κωδικοποιούν άλλες πρωτεΐνες. Οι πιο συνήθεις μελέτες συσχέτισης αφορούσαν πολυμορφισμούς γονιδίων μορίων που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απάντηση ή κωδικοποιούν παράγοντες του μεταβολισμού των λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός -634C/G του γονιδίου της ιντερλευκίνης 6 έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις της CRP σε μη καπνιστές,<sup>421</sup> ενώ ο CC γονότυπος του πολυμορφισμού -174G/C του ίδιου γονιδίου είναι συχνότερος σε ασθενείς με αυξημένες τιμές CRP.<sup>422</sup> Επιπλέον, και μεταβολές του γονιδίου της ιντερλευκίνης-1 φαίνεται να ρυθμίζουν τα επίπεδα CRP της περιφέρειας.<sup>423</sup> Οι ομοζυγώτες του A αλληλίου του G-308A πολυμορφισμού του TNF-α παράγοντα εμφάνισαν υψηλότερες τιμές CRP σε ομάδες λευκών και μαύρων ανδρών και μαύρων γυναικών.<sup>424</sup> Ο πολυμορφισμός C260T του γονιδίου του CD14 υποδοχέα, ενός σημαντικού μεσολαβητή της φλεγμονής, φαίνεται να σχετίζεται με τα επίπεδα της CRP. Ο TT γονότυπος παρατηρείται συχνότερα σε επίπεδα CRP>0.3mg/dL.<sup>425</sup>

Ο πολυμορφισμός G894T του γονιδίου της συνθάσης του ενδοθηλιακού NO, που έχει συσχετιστεί με την ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια, παρουσιάζει διαφορές στα επίπεδα της CRP ανά γονότυπο. Οι φορείς του T αλληλίου εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα CRP.<sup>426</sup> Διάφορες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη συσχέτιση των πολυμορφισμών του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E με τη διακύμανση της CRP σε νέους και παιδιά,<sup>427</sup> σε άτομα με χαμηλή HDL ή φυσιολογικά λιπίδια<sup>428</sup> και σε ασθενείς με σταθερή ή με ασταθή ΣΝ.<sup>429</sup> Επιπλέον, συσχετίσεις με τις συγκεντρώσεις της CRP έχουν αναγνωρισθεί και σε πολυμορφισμούς γονιδίων που κωδικοποιούν τον οξειδωμένο υποδοχέα της LDL χοληστερόλης,<sup>430</sup> τη ρεζιστίνη,<sup>431</sup> την πρωτεΐνη ενεργοποίησης της 5-λιποξυγενάσης<sup>432</sup> και τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.<sup>433</sup> Οι αναφορές σχετικά με τον I/D πολυμορφισμό του ACE και τη συσχέτισή του με τις συγκεντρώσεις της hsCRP είναι σε γενικές γραμμές αρνητικές.<sup>434</sup> Και στον Ελλαδικό χώρο έχει βρεθεί ότι σε φυσιολογικούς ενήλικες ο πολυμορφισμός του ACE δεν επιδρά στα επίπεδα της hsCRP.<sup>435</sup> Αντίθετα, σε γυναίκες από τη Σκανδιναβία φάνηκε ότι το A αλληλίο του πολυμορφισμού +1166A>C του γονιδίου του AT1 υποδοχέα σχετίζεται με την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων hsCRP.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συσχέτιση των τιμών της CRP με τους τέσσερις πολυμορφισμούς των γονιδίων του αγγειοτενσινογόνου, του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, της ρενίνης και του υποδοχέα A των νατριουρητικών πεπτιδίων. Δεν αναδείχθηκαν διαφορές στις συγκεντρώσεις του hsCRP μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων που διερευνήθηκαν στην ομάδα των ασθενών. Φαίνεται ότι η σημαντικές συσχετίσεις που αναδείχθηκαν από την παρούσα μελέτη σε ότι αφορά τη ΣΝ δε μεσολαβούνται ή δεν εκφράζονται και από μια παράλληλη αύξηση της φλεγμονώδους αντίδρασης του αγγειακού τοιχώματος. Άλλωστε και στη σύγκριση μεταξύ των υποομάδων των ασθενών ως προς τη βαρύτητα της ΣΝ, δεν αναδείχθηκαν διαφορές στις συγκεντρώσεις της hsCRP.

### **Περιορισμοί της μελέτης**

Η παρούσα μελέτη περιελάμβανε στεφανιαίους ασθενείς με ιστορικό προσφάτου OEM. Η επίπτωση των κλασικών παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα της ΣΝ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Για το λόγο αυτό, τα συμπεράσματα που αφορούν συσχετίσεις ενός γονοτύπου με μια πολύπλοκη νόσο όπως είναι η ΣΝ πρέπει να εξάγονται με προσοχή, καθώς οι παρατηρούμενες διαφορές μπορεί να σχετίζονται με την παρουσία των συνυπαρχόντων παραγόντων κινδύνου. Επιπλέον, υπάρχουν παράγοντες μη

επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων τέτοιου είδους μελετών, όπως οι διαφορές στο τελικό φαινότυπο, το γενετικό υπόβαθρο του υπό εξέταση πληθυσμού, η σχετικά μικρή επίδραση μονήρων γενετικών μεταβολών σε πολύπλοκους φαινοτύπους, καθώς και το γεγονός ότι τα αποτελέσματα μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν τη συσχέτιση του φαινοτύπου με τον υπό εξέταση πολυμορφισμό, αλλά μπορεί να οφείλονται στην επίδραση μιας άλλης μετάλλαξης που βρίσκεται κοντά γενετικά (close disequilibrium) με το μελετώμενο γονίδιο. Η παρούσα μελέτη δεν είχε την απαραίτητη ισχύ για να διερευνήσει το σχετικό κίνδυνο εμφάνισης Ζαγγειακής ΣΝ. Για το λόγο αυτό τα αποτελέσματά της θα πρέπει να θεωρούνται ενδεικτικά μέχρι μεγαλύτερες και επικεντρωμένες σε αυτό το σημείο μελέτες να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα.

### ***Μελλοντικές προοπτικές – η σημασία της παρούσας μελέτης***

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ανέδειξαν για πρώτη φορά μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ενός γονοτύπου του γονιδίου του AGT με τη βαρύτητα της ΣΝ. Η σημασία του ευρήματος, καθώς και άλλων παρόμοιων γενετικών συσχετίσεων, μπορεί να προσεγγιστεί με βάση τη γενικότερη θεώρηση του σκοπού διερεύνησης του γενετικού υποβάθρου των διάφορων νοσημάτων. Η αναζήτηση γενετικών τόπων, γονιδίων ή πολυμορφισμών γονιδίων που συνδέονται αιτιολογικά με την παρουσία σημαντικών ασθενειών μπορεί να επιφέρει σημαντικές εξελίξεις στη μορφή της μελλοντικής προσέγγισης αυτών τόσο σε επίπεδο προγνωστικό (πρωτοπαθής πρόληψη), όσο και σε επίπεδο θεραπευτικό (εξατομικευμένη θεραπεία).

Σε ότι αφορά τον προγνωστικό ρόλο της αναγνώρισης γονοτύπων που σχετίζονται με συγκεκριμένες ασθένειες, είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι πολλές φορές είναι δυσδιάκριτο κατά πόσο ένας γονότυπος αποτελεί παράγοντα κινδύνου ή αιτιολογικό παράγοντα της αντίστοιχης νόσου. Ωστόσο, η στατιστικώς σημαντική συνύπαρξη του δίπτυχου γονοτύπου-φαινοτύπου είναι αρκετή ώστε να επιφέρει αλλαγές στον τρόπο αντιμετώπισης των φορέων του γονοτύπου αυτού. Ο μελλοντικός στόχος της πρωτογενούς πρόληψης των νοσημάτων έγκειται στην ενσωμάτωση στα μοντέλα υπολογισμού του κινδύνου εμφάνισης μιας ασθένειας (score) και γενετικών παραγόντων ώστε να γίνει αποτελεσματικότερη διαστρωμάτωση κινδύνου στο γενικό πληθυσμό. Έτσι η πιθανή ανίχνευση για

παράδειγμα 5 διαφορετικών γονοτύπων (αλληλία πολυμορφισμού, απλότυποι ή γονίδια) που σχετίζονται με την εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων, μπορεί να εισάγει τους γονοτύπους αυτούς ως παράγοντες στα ήδη γνωστά μοντέλα καρδιαγγειακού κινδύνου (Framingham score, EUROSCORE). Έτσι άτομα χαμηλού κινδύνου για καρδιαγγειακά συμβάματα (με βάση τη σημερινή μορφή των μοντέλων αυτών), μπορεί αν είναι φορείς και των 5 «επικίνδυνων» γονοτύπων να εντάσσονται πλέον σε υψηλότερου κινδύνου ομάδες (πχ ενδιάμεσου κινδύνου). Με αυτόν τον τρόπο γίνεται εξατομίκευση του προβλεπτικού score και ανάλογα μεταβάλλονται οι στόχοι θεραπείας όλων των τροποποιήσιμων παραγόντων (πχ για την περίπτωση που αναφέρθηκε το κάπνισμα, τα λιπίδια ορού, η αρτηριακή πίεση, το σωματικό βάρος).

**Πίνακας 20. Προβλεπτική αξία του γενετικού μοντέλου κινδύνου για την πρόγνωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων στη μελέτη ARIC**

ACRS τριτημόριο	Αριθμός ατόμων (στεφανιαία συμβάματα)	Σχετικός κίνδυνος*	95% διάστημα εμπιστοσύνης	p-value
Λευκοί				
1ο	2787 (69)	1.16	1.02-1.31	0.02
2ο	2771 (234)	1.11	1.03-1.19	<0.01
3ο	2803 (585)	1.09	1.04-1.14	<0.01
Μαύροι				
1ο	847 (17)	1.50	1.14-1.97	<0.01
2ο	887 (51)	1.33	1.15-1.54	<0.01
3ο		1.12	1.03-1.23	<0.01

ARCS: το score του αθηρωματικού κινδύνου της μελέτης ARIC, \*: ο σχετικός κίνδυνος αφορά την αύξηση του κινδύνου για ΣΝ που αναλογεί σε αύξηση κατά 1 μονάδα του γενετικού score.

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορα γενετικά μοντέλα κινδύνου για τη ΣΝ τα οποία εμπεριέχουν γενετικούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται με αυτή. Στο πιο σημαντικό από αυτά και με βάση 116 γενετικούς πολυμορφισμούς, σχετιζόμενους με τη ΣΝ, υπολογίστηκε ένα γενετικό μοντέλο κινδύνου το οποίο προσαρμόστηκε στο κλασικό μοντέλο καρδιαγγειακού κινδύνου της μελέτης ARIC. Όπως επιβεβαιώθηκε η προσθήκη των γενετικών παραμέτρων αύξησε την προγνωστική ικανότητα του μοντέλου τόσο στους μαύρους όσο και στους λευκούς συμμετέχοντες (πίνακας 20).<sup>436</sup>

Σε θεωρητικό επίπεδο η μελλοντική δυνατότητα πλήρους καταγραφής του γενετικού υλικού κάθε ατόμου μπορεί να προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την πιθανότητα εμφάνισης νοσημάτων, γεγονός που αυξάνει την ατομική ευθύνη και διευκολύνει τον προγραμματισμό και τη διενέργεια αποτελεσματικών προγραμμάτων πρωτοπαθούς πρόληψης. Η δυνατότητα αυτή θα καταστεί δυνατή από τα αποτελέσματα χιλιάδων μελετών συσχέτισης γονοτύπου-φαινοτύπου, παρόμοιων με την παρούσα μελέτη, με βάση τις οποίες θα καθοριστούν οι αλληλουχίες, μεταλλάξεις ή γονίδια «κινδύνου» και η ισχύς της επίδρασης αυτών στον τελικό φαινότυπο.

## V. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη που διενεργήθηκε σε ομοιογενή Ελληνικό πληθυσμό, αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά μια συσχέτιση του SS γονοτύπου του πολυμορφισμού AGT(CA)<sub>n</sub> με αυξημένο κίνδυνο 3αγγειακής ΣΝ, τόσο μεταξύ των στεφανιαίων ασθενών, όσο και σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ ο SL γονότυπος φαίνεται να ασκεί προστατευτική δράση. Ο SL γονότυπος του πολυμορφισμού REN (TCTG)<sub>n</sub> σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για ΣΝ, ενώ οι γονότυποι SS και LL με μειωμένο κίνδυνο, αν και αυτές οι συσχετίσεις δε διατηρήθηκαν μετά από διόρθωση ως προς τους συνυπάρχοντες παράγοντες κινδύνου. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί I/D και (CT)<sub>n</sub> των γονιδίων ACE και NPRA αντίστοιχα δε σχετίστηκαν με την επίπτωση ή με την έκταση της ΣΝ σε ασθενείς με ιστορικό OEM. Οι συγκεντρώσεις της hsCRP, ως δείκτης μέτρησης της φλεγμονώδους αντίδρασης, δε διέφεραν μεταξύ των υπό εξέταση γονοτύπων. Απαιτείται η διενέργεια μεγαλύτερων μελετών με σκοπό την επαλήθευση των

παραπάνω αποτελεσμάτων και την εξαγωγή πιο ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο του πολυμορφισμού του AGT στην εμφάνιση ζαγγειακής ΣΝ, ώστε να εξακριβωθεί η σημασία του ως παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



1. Genest JJ, Jr., Martin-Munley SS, McNamara JR, et al. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992;85:2025-33.
2. Chaer RA, Billeh R, Massad MG. Genetics and gene manipulation therapy of premature coronary artery disease. *Cardiology* 2004;101:122-30.
3. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet* 1999;353:89-92.
4. Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117:e25-146.
5. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Antonoulas A, et al. Epidemiology of acute coronary syndromes in a Mediterranean country; aims, design and baseline characteristics of the Greek study of acute coronary syndromes (GREECS). *BMC Public Health* 2005;5:23.
6. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355-74.
7. Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* 1988;60:459-64.
8. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
9. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997;336:1276-82.
10. Davies MJ. The composition of coronary-artery plaques. *N Engl J Med* 1997;336:1312-4.
11. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, et al. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart* 1999;82:269-72.
12. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996;94:2013-20.
13. Davies MJ, Thomas AC, Knapman PA, Hangartner JR. Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation* 1986;73:418-27.
14. Falk E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation* 1985;71:699-708.
15. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-71.
16. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-5.
17. Braunwald E. Unstable angina: an etiologic approach to management. *Circulation* 1998;98:2219-22.
18. Ambrose JA, Winters SL, Stern A, et al. Angiographic morphology and the pathogenesis of unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol* 1985;5:609-16.
19. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-9.
20. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997;96:4095-103.

21. Libby P, Ridker PM. Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation* 1999;100:1148-50.
22. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003;144:2179-83.
23. Admiraal PJ, Derkx FH, Danser AH, Pieterman H, Schalekamp MA. Metabolism and production of angiotensin I in different vascular beds in subjects with hypertension. *Hypertension* 1990;15:44-55.
24. Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, et al. Renin in dog brain. *Am J Physiol* 1971;221:1733-7.
25. Nielsen AH, Schauser KH, Poulsen K. Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta* 2000;21:468-77.
26. Sernia C. A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system. *JOP* 2001;2:50-5.
27. Spat A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev* 2004;84:489-539.
28. Miyazaki M, Takai S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. *J Pharmacol Sci* 2006;100:391-7.
29. Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1993;91:2058-64.
30. Danser AH. Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem* 1996;157:211-6.
31. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 1990;265:22348-57.
32. Saris JJ, van Dijk MA, Kroon I, Schalekamp MA, Danser AH. Functional importance of angiotensin-converting enzyme-dependent in situ angiotensin II generation in the human forearm. *Hypertension* 2000;35:764-8.
33. Koka V, Wang W, Huang XR, Kim-Mitsuyama S, Truong LD, Lan HY. Advanced glycation end products activate a chymase-dependent angiotensin II-generating pathway in diabetic complications. *Circulation* 2006;113:1353-60.
34. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;87:E1-9.
35. Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006;47:515-21.
36. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, et al. Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol* 2004;165:1019-32.
37. Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 2005;436:112-6.
38. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;417:822-8.
39. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003;426:450-4.
40. Zisman LS, Keller RS, Weaver B, et al. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation* 2003;108:1707-12.
41. Lieb W, Graf J, Gotz A, et al. Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. Results of the MONICA Augsburg echocardiographic substudy. *J Mol Med* 2006;84:88-96.
42. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415-72.

43. Carey RM. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT<sub>2</sub> receptor comes of age. *Hypertension* 2005;45:840-4.
44. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. *Kidney Int* 2002;61:1986-95.
45. Esteban V, Lorenzo O, Ruperez M, et al. Angiotensin II, via AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1514-29.
46. Chai SY, Fernando R, Peck G, et al. The angiotensin IV/AT<sub>4</sub> receptor. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2728-37.
47. Esteban V, Ruperez M, Sanchez-Lopez E, et al. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2005;96:965-73.
48. Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension* 2005;46:1069-76.
49. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 2005;111:1806-13.
50. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8258-63.
51. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1560-6.
52. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:651-7.
53. AbdAlla S, Lother H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor is an AT<sub>1</sub> receptor antagonist. *J Biol Chem* 2001;276:39721-6.
54. Li J, Culman J, Hortnagl H, et al. Angiotensin AT<sub>2</sub> receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J* 2005;19:617-9.
55. Kohlstedt K, Brandes RP, Muller-Esterl W, Busse R, Fleming I. Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. *Circ Res* 2004;94:60-7.
56. Hilgers KF, Veelken R, Muller DN, et al. Renin uptake by the endothelium mediates vascular angiotensin formation. *Hypertension* 2001;38:243-8.
57. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002;109:1417-27.
58. Burckle CA, Jan Danser AH, Muller DN, et al. Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension* 2006;47:552-6.
59. Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* 1991;324:1098-104.
60. Campbell DJ, Woodward M, Chalmers JP, et al. Prediction of myocardial infarction by N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide, C-reactive protein, and renin in subjects with cerebrovascular disease. *Circulation* 2005;112:110-6.
61. Campbell DJ, Aggarwal A, Esler M, Kaye D. beta-blockers, angiotensin II, and ACE inhibitors in patients with heart failure. *Lancet* 2001;358:1609-10.
62. Brunner HR, Gavras H. Angiotensin blockade for hypertension: a promise fulfilled. *Lancet* 2002;359:990-2.
63. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Scholkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 1995;47:25-49.

64. Campbell DJ, Krum H, Esler MD. Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans. *Circulation* 2005;111:315-20.
65. Azizi M, Rousseau A, Ezan E, et al. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *J Clin Invest* 1996;97:839-44.
66. Azizi M, Webb R, Nussberger J, Hollenberg NK. Renin inhibition with aliskiren: where are we now, and where are we going? *J Hypertens* 2006;24:243-56.
67. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation* 2005;111:1012-8.
68. Hall JE. The renin-angiotensin system: renal actions and blood pressure regulation. *Compr Ther* 1991;17:8-17.
69. Ichikawa I, Harris RC. Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone. *Kidney Int* 1991;40:583-96.
70. Hall JE, Brands MW, Henegar JR. Angiotensin II and long-term arterial pressure regulation: the overriding dominance of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999;10 Suppl 12:S258-65.
71. Ferrario C, Abdelhamed AI, Moore M. All antagonists in hypertension, heart failure, and diabetic nephropathy: focus on losartan. *Curr Med Res Opin* 2004;20:279-93.
72. Re RN. Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension* 2003;42:117-22.
73. Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, et al. Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regul Pept* 2004;120:5-13.
74. Danser AH. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:759-68.
75. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 1990;67:1355-64.
76. Weber KT, Brilla CG, Campbell SE. Regulatory mechanisms of myocardial hypertrophy and fibrosis: results of in vivo studies. *Cardiology* 1992;81:266-73.
77. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.
78. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.
79. Ullian ME, Hutchison FN, Hazen-Martin DJ, Morinelli TA. Angiotensin II-aldosterone interactions on protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993;264:C1525-31.
80. Xiao F, Puddefoot JR, Barker S, Vinson GP. Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 2004;44:340-5.
81. Jaffe IZ, Mendelsohn ME. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 2005;96:643-50.
82. Glossmann H, Baukal A, Catt KJ. Angiotensin II receptors in bovine adrenal cortex. Modification of angiotensin II binding by guanyl nucleotides. *J Biol Chem* 1974;249:664-6.
83. Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991;351:230-3.

84. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000;52:639-72.
85. Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:1-6.
86. Methot D, Silversides DW, Reudelhuber TL. In vivo enzymatic assay reveals catalytic activity of the human renin precursor in tissues. *Circ Res* 1999;84:1067-72.
87. Prescott G, Silversides DW, Reudelhuber TL. Tissue activity of circulating prorenin. *Am J Hypertens* 2002;15:280-5.
88. Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME, et al. Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000;36:1099-104.
89. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-7.
90. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
91. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767-72.
92. Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* 2004;94:534-41.
93. Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res* 2000;87:1195-201.
94. Rabbani R, Topol EJ. Strategies to achieve coronary arterial plaque stabilization. *Cardiovasc Res* 1999;41:402-17.
95. Takagishi T, Murahashi N, Azagami S, Morimatsu M, Sasaguri Y. Effect of angiotensin II and thromboxane A<sub>2</sub> on the production of matrix metalloproteinase by human aortic smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int* 1995;35:265-73.
96. Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:826-8.
97. Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, et al. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 1999;100:1646-52.
98. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:645-51.
99. Dandona P, Kumar V, Aljada A, et al. Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4496-501.
100. Chen HJ, Li DY, Saldeen T, Phillips MI, Mehta JL. Attenuation of tissue P-selectin and MCP-1 expression and intimal proliferation by AT<sub>1</sub> receptor blockade in hyperlipidemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:474-9.
101. Martin G, Dol F, Mares AM, et al. Lesion progression in apoE-deficient mice: implication of chemokines and effect of the AT<sub>1</sub> angiotensin II receptor antagonist irbesartan. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43:191-9.
102. Fliser D, Buchholz K, Haller H. Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation. *Circulation* 2004;110:1103-7.

103. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-8.
104. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-37.
105. Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F, Bohm M, Seewald S, Vetter H. Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997;95:473-8.
106. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999;99:2027-33.
107. John S, Delles C, Klingbeil AU, Jacobi J, Schlaich MP, Schmieder RE. Low-density lipoprotein-cholesterol determines vascular responsiveness to angiotensin II in normocholesterolaemic humans. *J Hypertens* 1999;17:1933-9.
108. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 1996;94:258-65.
109. Antony I, Lerebours G, Nitenberg A. Angiotensin-converting enzyme inhibition restores flow-dependent and cold pressor test-induced dilations in coronary arteries of hypertensive patients. *Circulation* 1996;94:3115-22.
110. Klingbeil AU, John S, Schneider MP, Jacobi J, Handrock R, Schmieder RE. Effect of AT1 receptor blockade on endothelial function in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2003;16:123-8.
111. Hornig B, Landmesser U, Kohler C, et al. Comparative effect of ace inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase. *Circulation* 2001;103:799-805.
112. Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:505-10.
113. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007.
114. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 2005;45:526-9.
115. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:145-53.
116. Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 2003;362:782-8.
117. Braunwald E, Domanski MJ, Fowler SE, et al. Angiotensin-converting-enzyme inhibition in stable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004;351:2058-68.
118. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002;359:995-1003.
119. Skeggs LT, Jr., Kahn JR, Lentz K, Shumway NP. The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J Exp Med* 1957;106:439-53.
120. Nussberger J, Wuerzner G, Jensen C, Brunner HR. Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril. *Hypertension* 2002;39:E1-8.

121. Franken AA, Derkx FH, Man in't Veld AJ, et al. High plasma prorenin in diabetes mellitus and its correlation with some complications. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1008-15.
122. Stanton A, Jensen C, Nussberger J, O'Brien E. Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren. *Hypertension* 2003;42:1137-43.
123. Pool JL, Schmieder RE, Azizi M, et al. Aliskiren, an orally effective renin inhibitor, provides antihypertensive efficacy alone and in combination with valsartan. *Am J Hypertens* 2007;20:11-20.
124. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981;28:89-94.
125. Maack T, Suzuki M, Almeida FA, et al. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 1987;238:675-8.
126. Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H17-29.
127. Lang RE, Unger T, Ganten D. Atrial natriuretic peptide: a new factor in blood pressure control. *J Hypertens* 1987;5:255-71.
128. Nicholls MG, Espiner EA, Ikram H, Crozier IG, Richards AM. Atrial natriuretic peptide in human hypertension. *Eur Heart J* 1987;8 Suppl B:123-8.
129. Pitzalis MV, Iacoviello M, Massari F, et al. Influence of gender and family history of hypertension on autonomic control of heart rate, diastolic function and brain natriuretic peptide. *J Hypertens* 2001;19:143-8.
130. Mo R, Myking OL, Lund-Johansen P, Omvik P. The Bergen Blood Pressure Study: inappropriately low levels of circulating atrial natriuretic peptide in offspring of hypertensive families. *Blood Press* 1994;3:223-30.
131. Clarkson PB, Wheeldon NM, Macleod C, Coutie W, MacDonald TM. Acute effects of atrial natriuretic peptide on left ventricular diastolic function. a pulsed wave Doppler study in man. *Eur Heart J* 1995;16:1710-15.
132. Clarkson PB, Wheeldon NM, Macleod C, Coutie W, MacDonald TM. Brain natriuretic peptide: effect on left ventricular filling patterns in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)* 1995;88:159-64.
133. Garcia R, Thibault G, Cantin M. Correlation between cardiac hypertrophy and plasma levels of atrial natriuretic factor in non-spontaneous models of hypertension in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;145:532-41.
134. Jernberg T, James S, Lindahl B, et al. Natriuretic peptides in unstable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2004;25:1486-93.
135. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2357-68.
136. Casco VH, Veinot JP, Kuroski de Bold ML, Masters RG, Stevenson MM, de Bold AJ. Natriuretic peptide system gene expression in human coronary arteries. *J Histochem Cytochem* 2002;50:799-809.
137. Doust JA, Glasziou PP, Pietrzak E, Dobson AJ. A systematic review of the diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure. *Arch Intern Med* 2004;164:1978-84.
138. Clerico A, Fontana M, Zyw L, Passino C, Emdin M. Comparison of the diagnostic accuracy of brain natriuretic peptide (BNP) and the N-terminal part of the propeptide of BNP immunoassays in chronic and acute heart failure: a systematic review. *Clin Chem* 2007;53:813-22.
139. Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, Glasziou P. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *BMJ* 2005;330:625.
140. Cao L, Wu J, Gardner DG. Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor. *J Biol Chem* 1995;270:24891-7.

141. Hum D, Besnard S, Sanchez R, et al. Characterization of a cGMP-response element in the guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A gene promoter. *Hypertension* 2004;43:1270-8.
142. Chen S, Ni XP, Humphreys MH, Gardner DG. 1,25 dihydroxyvitamin d amplifies type a natriuretic peptide receptor expression and activity in target cells. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:329-39.
143. Garg R, Pandey KN. Angiotensin II-mediated negative regulation of Npr1 promoter activity and gene transcription. *Hypertension* 2003;41:730-6.
144. Chen S, Gardner DG. Osmoregulation of natriuretic peptide receptor signaling in inner medullary collecting duct. A requirement for p38 MAPK. *J Biol Chem* 2002;277:6037-43.
145. Chen S, Cao L, Intengan HD, Humphreys M, Gardner DG. Osmoregulation of endothelial nitric-oxide synthase gene expression in inner medullary collecting duct cells. Role in activation of the type A natriuretic peptide receptor. *J Biol Chem* 2002;277:32498-504.
146. Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, et al. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 1995;378:65-8.
147. Oliver PM, Fox JE, Kim R, et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14730-5.
148. Kilic A, Velic A, De Windt LJ, et al. Enhanced activity of the myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation* 2005;112:2307-17.
149. Oliver PM, John SW, Purdy KE, et al. Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2547-51.
150. Lopez MJ, Garbers DL, Kuhn M. The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem* 1997;272:23064-8.
151. Dubois SK, Kishimoto I, Lillis TO, Garbers DL. A genetic model defines the importance of the atrial natriuretic peptide receptor (guanylyl cyclase-A) in the regulation of kidney function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4369-73.
152. Shi SJ, Vellaichamy E, Chin SY, Smithies O, Navar LG, Pandey KN. Natriuretic peptide receptor A mediates renal sodium excretory responses to blood volume expansion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F694-702.
153. Nishikimi T, Hagaman JR, Takahashi N, et al. Increased susceptibility to heart failure in response to volume overload in mice lacking natriuretic peptide receptor-A gene. *Cardiovasc Res* 2005;66:94-103.
154. Knowles JW, Esposito G, Mao L, et al. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest* 2001;107:975-84.
155. Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2703-6.
156. Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, et al. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 2003;111:1399-407.
157. Holtwick R, Gotthardt M, Skryabin B, et al. Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7142-7.
158. Sabrane K, Kruse MN, Fabritz L, et al. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J Clin Invest* 2005;115:1666-74.



159. Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, et al. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF-kappaB activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001;108:203-13.
160. Rehemudula D, Nakayama T, Soma M, et al. Structure of the type B human natriuretic peptide receptor gene and association of a novel microsatellite polymorphism with essential hypertension. *Circ Res* 1999;84:605-10.
161. Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, et al. Systematic screening of type B human natriuretic peptide receptor gene polymorphisms and association with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2001;15:471-4.
162. Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, et al. An insertion/deletion polymorphism in intron 18 of the type B human natriuretic peptide receptor gene is not associated with cerebral infarction. *Hypertens Res* 2000;23:173-6.
163. Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, et al. A C2077T polymorphism of the type B human natriuretic peptide receptor gene is not associated with myocardial infarction. *Med Sci Monit* 2000;6:1056-60.
164. Iemitsu M, Maeda S, Otsuki T, et al. Arterial stiffness, physical activity, and atrial natriuretic Peptide gene polymorphism in older subjects. *Hypertens Res* 2008;31:767-74.
165. Lanfear DE, Stolker JM, Marsh S, Rich MW, McLeod HL. Genetic variation in the B-type natriuretic peptide pathway affects BNP levels. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21:55-62.
166. Vassalle C, Andreassi MG, Prontera C, et al. Influence of Scal and natriuretic peptide (NP) clearance receptor polymorphisms of the NP System on NP concentration in chronic heart failure. *Clin Chem* 2007;53:1886-90.
167. Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, et al. Structure and polymorphisms of the human natriuretic peptide receptor C gene. *Endocrine* 2002;17:85-90.
168. Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, Salvi F, et al. A novel promoter variant of the natriuretic peptide clearance receptor gene is associated with lower atrial natriuretic peptide and higher blood pressure in obese hypertensives. *J Hypertens* 1999;17:1301-5.
169. Pitzalis MV, Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, et al. Allelic variants of natriuretic peptide receptor genes are associated with family history of hypertension and cardiovascular phenotype. *J Hypertens* 2003;21:1491-6.
170. Lee JK, Kim HT, Cho SM, et al. Characterization of 458 single nucleotide polymorphisms of disease candidate genes in the Korean population. *J Hum Genet* 2003;48:213-6.
171. Aoi N, Soma M, Nakayama T, et al. Variable number of tandem repeat of the 5'-flanking region of type-C human natriuretic peptide receptor gene influences blood pressure levels in obesity-associated hypertension. *Hypertens Res* 2004;27:711-6.
172. Sarzani R, Strazzullo P, Salvi F, et al. Natriuretic peptide clearance receptor alleles and susceptibility to abdominal adiposity. *Obes Res* 2004;12:351-6.
173. Entman ML, Michael L, Rossen RD, et al. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB J* 1991;5:2529-37.
174. Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, et al. C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:97-103.
175. Lowe GD, Pepys MB. C-reactive protein and cardiovascular disease: weighing the evidence. *Curr Atheroscler Rep* 2006;8:421-8.
176. Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med* 2004;351:2611-8.
177. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111:1805-12.
178. Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990;65:168-72.

179. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-24.
180. Danesh J, Erqou S, Walker M, et al. The Emerging Risk Factors Collaboration: analysis of individual data on lipid, inflammatory and other markers in over 1.1 million participants in 104 prospective studies of cardiovascular diseases. *Eur J Epidemiol* 2007;22:839-69.
181. de Beer FC, Soutar AK, Baltz ML, Trayner IM, Feinstein A, Pepys MB. Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein. *J Exp Med* 1982;156:230-42.
182. Pepys MB, Rowe IF, Baltz ML. C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. *Int Rev Exp Pathol* 1985;27:83-111.
183. Zhang YX, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;145:375-9.
184. Pepys MB. CRP or not CRP? That is the question. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1091-4.
185. Scirica BM, Morrow DA. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The verdict is still out. *Circulation* 2006;113:2128-34; discussion 51.
186. Verma S, Devaraj S, Jialal I. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation* 2006;113:2135-50; discussion 50.
187. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.
188. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2003;10:S1-S10.
189. Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, et al. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* 1999;190:1733-40.
190. Osmand AP, Friedenson B, Gewurz H, Painter RH, Hofmann T, Shelton E. Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentaxins). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:739-43.
191. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983;34:141-212.
192. Kinoshita CM, Ying SC, Hugli TE, et al. Elucidation of a protease-sensitive site involved in the binding of calcium to C-reactive protein. *Biochemistry* 1989;28:9840-8.
193. Tennent GA, Lovat LB, Pepys MB. Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4299-303.
194. Volanakis JE, Kaplan MH. Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;136:612-4.
195. Volanakis JE, Wirtz KW. Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature* 1979;281:155-7.
196. Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and

sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2000;192:1353-64.

197. Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13043-8.

198. Hart SP, Alexander KM, MacCall SM, Dransfield I. C-reactive protein does not opsonize early apoptotic human neutrophils, but binds only membrane-permeable late apoptotic cells and has no effect on their phagocytosis by macrophages. *J Inflamm (Lond)* 2005;2:5.

199. Vigo C. Effect of C-reactive protein on platelet-activating factor-induced platelet aggregation and membrane stabilization. *J Biol Chem* 1985;260:3418-22.

200. Bhakdi S, Torzewski M, Paprotka K, et al. Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence. *Circulation* 2004;109:1870-6.

201. Rowe IF, Soutar AK, Trayner IM, Thompson GR, Pepys MB. Circulating human C-reactive protein binds very low density lipoproteins. *Clin Exp Immunol* 1984;58:237-44.

202. Du Clos TW. C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *J Immunol* 1989;143:2553-9.

203. Pepys MB, Booth SE, Tennent GA, Butler PJ, Williams DG. Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. *Clin Exp Immunol* 1994;97:152-7.

204. Kaplan MH, Volanakis JE. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol* 1974;112:2135-47.

205. Siegel J, Rent R, Gewurz H. Interactions of C-reactive protein with the complement system. I. Protamine-induced consumption of complement in acute phase sera. *J Exp Med* 1974;140:631-47.

206. Volanakis JE. Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann N Y Acad Sci* 1982;389:235-50.

207. Pepys MB, Dash AC, Fletcher TC, Richardson N, Munn EA, Feinstein A. Analogues in other mammals and in fish of human plasma proteins, C-reactive protein and amyloid P component. *Nature* 1978;273:168-70.

208. Baltz ML, de Beer FC, Feinstein A, et al. Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1982;389:49-75.

209. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2001;158:1039-51.

210. Sun H, Koike T, Ichikawa T, et al. C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. *Am J Pathol* 2005;167:1139-48.

211. Kushner I, Rzewnicki D, Samols D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med* 2006;119:166 e17-28.

212. Hutchinson WL, Noble GE, Hawkins PN, Pepys MB. The pentraxins, C-reactive protein and serum amyloid P component, are cleared and catabolized by hepatocytes in vivo. *J Clin Invest* 1994;94:1390-6.

213. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 1993;91:1351-7.

214. Hopkins PN, Williams RR. A survey of 246 suggested coronary risk factors. *Atherosclerosis* 1981;40:1-52.

215. Brotman DJ, Walker E, Lauer MS, O'Brien RG. In search of fewer independent risk factors. *Arch Intern Med* 2005;165:138-45.

216. Anand SS, Islam S, Rosengren A, et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J* 2008;29:932-40.
217. Rose G. Sick individuals and sick populations. *Int J Epidemiol* 1985;14:32-8.
218. Wald NJ, Hackshaw AK, Frost CD. When can a risk factor be used as a worthwhile screening test? *BMJ* 1999;319:1562-5.
219. Law MR, Wald NJ, Morris JK. The performance of blood pressure and other cardiovascular risk factors as screening tests for ischaemic heart disease and stroke. *J Med Screen* 2004;11:3-7.
220. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;350:1387-97.
221. Lawlor DA, Smith GD, Rumley A, Lowe GD, Ebrahim S. Associations of fibrinogen and C-reactive protein with prevalent and incident coronary heart disease are attenuated by adjustment for confounding factors. *British Women's Heart and Health Study. Thromb Haemost* 2005;93:955-63.
222. Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 2003;290:2945-51.
223. Timpson NJ, Lawlor DA, Harbord RM, et al. C-reactive protein and its role in metabolic syndrome: mendelian randomisation study. *Lancet* 2005;366:1954-9.
224. Lakoski SG, Cushman M, Palmas W, Blumenthal R, D'Agostino RB, Jr., Herrington DM. The relationship between blood pressure and C-reactive protein in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1869-74.
225. Sattar N, Scherbakova O, Ford I, et al. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes* 2004;53:2855-60.
226. Folsom AR, Pankow JS, Tracy RP, et al. Association of C-reactive protein with markers of prevalent atherosclerotic disease. *Am J Cardiol* 2001;88:112-7.
227. Barinas-Mitchell E, Cushman M, Meilahn EN, Tracy RP, Kuller LH. Serum levels of C-reactive protein are associated with obesity, weight gain, and hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 2001;153:1094-101.
228. Tracy RP, Psaty BM, Macy E, et al. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2167-76.
229. Ford ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22:1971-7.
230. Boekholdt SM, Meuwese MC, Day NE, et al. Plasma concentrations of ascorbic acid and C-reactive protein, and risk of future coronary artery disease, in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Br J Nutr* 2006;96:516-22.
231. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH, Myers GL. Distribution and correlates of C-reactive protein concentrations among adult US women. *Clin Chem* 2004;50:574-81.
232. Woodward M, Rumley A, Welsh P, MacMahon S, Lowe G. A comparison of the associations between seven hemostatic or inflammatory variables and coronary heart disease. *J Thromb Haemost* 2007;5:1795-800.
233. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Additive value of immunoassay-measured fibrinogen and high-sensitivity C-reactive protein levels for predicting incident cardiovascular events. *Circulation* 2006;114:381-7.
234. Miller GJ, Ireland HA, Cooper JA, et al. Relationship between markers of activated coagulation, their correlation with inflammation, and association with coronary heart disease (NPHSII). *J Thromb Haemost* 2008;6:259-67.

235. Miller M, Zhan M, Havas S. High attributable risk of elevated C-reactive protein level to conventional coronary heart disease risk factors: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2005;165:2063-8.
236. Shah T, Casas JP, Cooper JA, et al. Critical appraisal of CRP measurement for the prediction of coronary heart disease events: new data and systematic review of 31 prospective cohorts. *Int J Epidemiol* 2009;38:217-31.
237. Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, et al. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 2002;51:1596-600.
238. Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension* 2004;44:6-11.
239. Tunstall-Pedoe H, Smith WC. Cholesterol as a risk factor for coronary heart disease. *Br Med Bull* 1990;46:1075-87.
240. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001;286:64-70.
241. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999;100:230-5.
242. Ridker PM. Rosuvastatin in the primary prevention of cardiovascular disease among patients with low levels of low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein: rationale and design of the JUPITER trial. *Circulation* 2003;108:2292-7.
243. Mora S, Ridker PM. Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)--can C-reactive protein be used to target statin therapy in primary prevention? *Am J Cardiol* 2006;97:33A-41A.
244. Maroko PR, Carpenter CB, Chiariello M, et al. Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion. *J Clin Invest* 1978;61:661-70.
245. Nijmeijer R, Lagrand WK, Lubbers YT, et al. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Pathol* 2003;163:269-75.
246. de Beer FC, Baltz ML, Munn EA, et al. Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component in the rat. *Immunology* 1982;45:55-70.
247. Gill R, Kemp JA, Sabin C, Pepys MB. Human C-reactive protein increases cerebral infarct size after middle cerebral artery occlusion in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:1214-8.
248. Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, et al. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature* 2006;440:1217-21.
249. Kroop IG, Shackman NH. The C-reactive protein determination as an index of myocardial necrosis in coronary artery disease. *Am J Med* 1957;22:90-8.
250. Kushner I, Broder ML, Karp D. Control of the acute phase response. Serum C-reactive protein kinetics after acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 1978;61:235-42.
251. de Beer FC, Hind CR, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB. Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J* 1982;47:239-43.
252. Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999;99:855-60.
253. Kinjo K, Sato H, Ohnishi Y, et al. Impact of high-sensitivity C-reactive protein on predicting long-term mortality of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003;91:931-5.

254. Suleiman M, Aronson D, Reisner SA, et al. Admission C-reactive protein levels and 30-day mortality in patients with acute myocardial infarction. *Am J Med* 2003;115:695-701.
255. Pietila KO, Harmoinen AP, Jokiniitty J, Pasternack AI. Serum C-reactive protein concentration in acute myocardial infarction and its relationship to mortality during 24 months of follow-up in patients under thrombolytic treatment. *Eur Heart J* 1996;17:1345-9.
256. Suleiman M, Khatib R, Agmon Y, et al. Early inflammation and risk of long-term development of heart failure and mortality in survivors of acute myocardial infarction predictive role of C-reactive protein. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:962-8.
257. Bursi F, Weston SA, Killian JM, Gabriel SE, Jacobsen SJ, Roger VL. C-reactive protein and heart failure after myocardial infarction in the community. *Am J Med* 2007;120:616-22.
258. Kavsak PA, MacRae AR, Newman AM, et al. Elevated C-reactive protein in acute coronary syndrome presentation is an independent predictor of long-term mortality and heart failure. *Clin Biochem* 2007;40:326-9.
259. Shine B, de Beer FC, Pepys MB. Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein. *Clin Chim Acta* 1981;117:13-23.
260. Woloshin S, Schwartz LM. Distribution of C-reactive protein values in the United States. *N Engl J Med* 2005;352:1611-3.
261. Hutchinson WL, Koenig W, Frohlich M, Sund M, Lowe GD, Pepys MB. Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. *Clin Chem* 2000;46:934-8.
262. Lakoski SG, Cushman M, Criqui M, et al. Gender and C-reactive protein: data from the Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA) cohort. *Am Heart J* 2006;152:593-8.
263. Kelley-Hedgpeath A, Lloyd-Jones DM, Colvin A, et al. Ethnic differences in C-reactive protein concentrations. *Clin Chem* 2008;54:1027-37.
264. Yamada S, Gotoh T, Nakashima Y, et al. Distribution of serum C-reactive protein and its association with atherosclerotic risk factors in a Japanese population : Jichi Medical School Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2001;153:1183-90.
265. Greenfield JR, Samaras K, Jenkins AB, et al. Obesity is an important determinant of baseline serum C-reactive protein concentration in monozygotic twins, independent of genetic influences. *Circulation* 2004;109:3022-8.
266. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-8.
267. Calabro P, Chang DW, Willerson JT, Yeh ET. Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1112-3.
268. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Lowel H, Hutchinson WL, Pepys MB. Refinement of the association of serum C-reactive protein concentration and coronary heart disease risk by correction for within-subject variation over time: the MONICA Augsburg studies, 1984 and 1987. *Am J Epidemiol* 2003;158:357-64.
269. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA* 2005;294:1799-809.
270. Wood AM, White I, Thompson SG, Lewington S, Danesh J. Regression dilution methods for meta-analysis: assessing long-term variability in plasma fibrinogen among 27,247 adults in 15 prospective studies. *Int J Epidemiol* 2006;35:1570-8.
271. Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:655-70.

272. Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, et al. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 1996;272:731-4.
273. Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 1991;252:1651-6.
274. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-51.
275. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405:847-56.
276. Kaiser J. Biobanks. Population databases boom, from Iceland to the U.S. *Science* 2002;298:1158-61.
277. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937-52.
278. Raben N, Plotz P, Byrne BJ. Acid alpha-glucosidase deficiency (glycogenosis type II, Pompe disease). *Curr Mol Med* 2002;2:145-66.
279. Thomas CB, Cohen BH. The familial occurrence of hypertension and coronary artery disease, with observations concerning obesity and diabetes. *Ann Intern Med* 1955;42:90-127.
280. Rose G. Familial Patterns in Ischaemic Heart Disease. *Br J Prev Soc Med* 1964;18:75-80.
281. Rissanen AM. Familial occurrence of coronary heart disease: effect of age at diagnosis. *Am J Cardiol* 1979;44:60-6.
282. Hamsten A, de Faire U. Risk factors for coronary artery disease in families of young men with myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1987;59:14-9.
283. ten Kate LP, Boman H, Daiger SP, Motulsky AG. Familial aggregation of coronary heart disease and its relation to known genetic risk factors. *Am J Cardiol* 1982;50:945-53.
284. Allen G, Harvald B, Shields J. Measures of twin concordance. *Acta Genet Stat Med* 1967;17:475-81.
285. Antonarakis SE, Beckmann JS. Mendelian disorders deserve more attention. *Nat Rev Genet* 2006;7:277-82.
286. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:2804-8.
287. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest* 2004;114:1343-53.
288. Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004;305:869-72.
289. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:216-29.
290. Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA* 2007;297:1551-61.
291. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2004;141:137-47.
292. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006;367:651-8.
293. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation* 2003;107:1117-22.

294. Arnett DK, Baird AE, Barkley RA, et al. Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2007;115:2878-901.
295. Cambien F, Tiret L. Genetics of cardiovascular diseases: from single mutations to the whole genome. *Circulation* 2007;116:1714-24.
296. Damani SB, Topol EJ. Future use of genomics in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1933-40.
297. Reitsma PH, Rosendaal FR. Past and future of genetic research in thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:264-9.
298. Rosenzweig A. Scanning the genome for coronary risk. *N Engl J Med* 2007;357:497-9.
299. Topol EJ, McCarthy J, Gabriel S, et al. Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction. *Circulation* 2001;104:2641-4.
300. McCarthy JJ, Parker A, Salem R, et al. Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes. *J Med Genet* 2004;41:334-41.
301. Zwicker JI, Peyvandi F, Palla R, et al. The thrombospondin-1 N700S polymorphism is associated with early myocardial infarction without altering von Willebrand factor multimer size. *Blood* 2006;108:1280-3.
302. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002;347:1916-23.
303. Yamada A, Ichihara S, Murase Y, et al. Lack of association of polymorphisms of the lymphotoxin alpha gene with myocardial infarction in Japanese. *J Mol Med* 2004;82:477-83.
304. Pajukanta P, Cargill M, Viitanen L, et al. Two loci on chromosomes 2 and X for premature coronary heart disease identified in early- and late-settlement populations of Finland. *Am J Hum Genet* 2000;67:1481-93.
305. Francke S, Manraj M, Lacquemant C, et al. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27. *Hum Mol Genet* 2001;10:2751-65.
306. Wang L, Fan C, Topol SE, Topol EJ, Wang Q. Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science* 2003;302:1578-81.
307. Wang Q, Rao S, Shen GQ, et al. Premature myocardial infarction novel susceptibility locus on chromosome 1P34-36 identified by genomewide linkage analysis. *Am J Hum Genet* 2004;74:262-71.
308. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet* 2004;36:233-9.
309. Helgadottir A, Gretarsdottir S, St Clair D, et al. Association between the gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein and stroke replicated in a Scottish population. *Am J Hum Genet* 2005;76:505-9.
310. Helgadottir A, Manolescu A, Helgason A, et al. A variant of the gene encoding leukotriene A4 hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction. *Nat Genet* 2006;38:68-74.
311. Samani NJ, Burton P, Mangino M, et al. A genomewide linkage study of 1,933 families affected by premature coronary artery disease: The British Heart Foundation (BHF) Family Heart Study. *Am J Hum Genet* 2005;77:1011-20.
312. Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B, et al. A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nat Genet* 2002;30:210-4.



313. Harrap SB, Zammit KS, Wong ZY, et al. Genome-wide linkage analysis of the acute coronary syndrome suggests a locus on chromosome 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:874-8.
314. Hauser ER, Crossman DC, Granger CB, et al. A genomewide scan for early-onset coronary artery disease in 438 families: the GENECARD Study. *Am J Hum Genet* 2004;75:436-47.
315. Farrall M, Green FR, Peden JF, et al. Genome-wide mapping of susceptibility to coronary artery disease identifies a novel replicated locus on chromosome 17. *PLoS Genet* 2006;2:e72.
316. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426:789-96.
317. Skelding KA, Gerhard GS, Simari RD, Holmes DR, Jr. The effect of HapMap on cardiovascular research and clinical practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4:136-42.
318. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 2002;32:650-4.
319. Schreyer SA, Vick CM, LeBoeuf RC. Loss of lymphotoxin-alpha but not tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in mice. *J Biol Chem* 2002;277:12364-8.
320. Ozaki K, Inoue K, Sato H, et al. Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. *Nature* 2004;429:72-5.
321. Shiffman D, Ellis SG, Rowland CM, et al. Identification of four gene variants associated with myocardial infarction. *Am J Hum Genet* 2005;77:596-605.
322. Shiffman D, Rowland CM, Louie JZ, et al. Gene variants of VAMP8 and HNRPUL1 are associated with early-onset myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1613-8.
323. Luke MM, Kane JP, Liu DM, et al. A polymorphism in the protease-like domain of apolipoprotein(a) is associated with severe coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2030-6.
324. Iakoubova OA, Tong CH, Chokkalingam AP, et al. Asp92Asn polymorphism in the myeloid IgA Fc receptor is associated with myocardial infarction in two disparate populations: CARE and WOSCOPS. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2763-8.
325. Shiffman D, O'Meara ES, Bare LA, et al. Association of gene variants with incident myocardial infarction in the Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:173-9.
326. Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007;316:1491-3.
327. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 2007;357:443-53.
328. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007;316:1488-91.
329. Shen GQ, Rao S, Martinelli N, et al. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. *J Hum Genet* 2008;53:144-50.
330. Larson MG, Atwood LD, Benjamin EJ, et al. Framingham Heart Study 100K project: genome-wide associations for cardiovascular disease outcomes. *BMC Med Genet* 2007;8 Suppl 1:S5.
331. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 2008;17:806-14.
332. Shen GQ, Li L, Rao S, et al. Four SNPs on chromosome 9p21 in a South Korean population implicate a genetic locus that confers high cross-race risk for

- development of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:360-5.
333. Chen Z, Qian Q, Ma G, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of early-onset coronary artery disease. *Mol Biol Rep* 2009;36:889-93.
334. Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, et al. Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. *J Hum Genet* 2008;53:357-9.
335. Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet* 2008;40:217-24.
336. Hall AS, Sapsford R, Megarry SG, Ball SG. Inhibition of the renin-angiotensin system after acute myocardial infarction--treat first, select later? *Heart* 1996;76:73-8.
337. Hammoud RA, Vaccari CS, Nagamia SH, Khan BV. Regulation of the renin-angiotensin system in coronary atherosclerosis: a review of the literature. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3:937-45.
338. Prisant LM. Management of hypertension in patients with cardiac disease: use of renin-angiotensin blocking agents. *Am J Med* 2008;121:S8-15.
339. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-4.
340. Ambrosioni E, Bacchelli S, Degli Esposti D, Borghi C. ACE-inhibitors and atherosclerosis. *Eur J Epidemiol* 1992;8 Suppl 1:129-33.
341. Campbell-Boswell M, Robertson AL, Jr. Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. *Exp Mol Pathol* 1981;35:265-76.
342. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1419-24.
343. Gardner DG, Chen S, Glenn DJ, Grigsby CL. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension* 2007;49:419-26.
344. Sarzani R, Salvi F, Dessi-Fulgheri P, Rappelli A. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *J Hypertens* 2008;26:831-43.
345. van der Zander K, Houben AJ, Kroon AA, de Leeuw PW. Effects of brain natriuretic peptide on forearm vasculature: comparison with atrial natriuretic peptide. *Cardiovasc Res* 1999;44:595-600.
346. Hobbs A, Foster P, Prescott C, Scotland R, Ahluwalia A. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide. *Circulation* 2004;110:1231-5.
347. Judkins MP. Selective coronary arteriography. I. A percutaneous transfemoral technic. *Radiology* 1967;89:815-24.
348. Fytilli P, Giannatou E, Papanikolaou V, et al. Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta, and androgen receptor genes with knee osteoarthritis. *Clin Genet* 2005;68:268-77.
349. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992;71:169-80.
350. Isa MN, Boyd E, Morrison N, Harrap S, Clauser E, Connor JM. Assignment of the human angiotensinogen gene to chromosome 1q42-q43 by nonisotopic in situ hybridization [corrected]. *Genomics* 1990;8:598-600.
351. Takei Y, Joss JM, Kloas W, Rankin JC. Identification of angiotensin I in several vertebrate species: its structural and functional evolution. *Gen Comp Endocrinol* 2004;135:286-92.

352. Nibu Y, Takahashi S, Tanimoto K, Murakami K, Fukamizu A. Identification of cell type-dependent enhancer core element located in the 3'-downstream region of the human angiotensinogen gene. *J Biol Chem* 1994;269:28598-605.
353. Yang G, Sigmund CD. Regulatory elements required for human angiotensinogen expression in HepG2 cells are dispensable in transgenic mice. *Hypertension* 1998;31:734-40.
354. Sherrod M, Liu X, Zhang X, Sigmund CD. Nuclear localization of angiotensinogen in astrocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R539-46.
355. Gould AB, Green D. Kinetics of the human renin and human substrate reaction. *Cardiovasc Res* 1971;5:86-9.
356. Kim HS, Kregge JH, Kluckman KD, et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2735-9.
357. Merrill DC, Thompson MW, Carney CL, et al. Chronic hypertension and altered baroreflex responses in transgenic mice containing the human renin and human angiotensinogen genes. *J Clin Invest* 1996;97:1047-55.
358. Ganten D, Wagner J, Zeh K, et al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7806-10.
359. Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1269-75.
360. Batalla A, Alvarez R, Reguero JR, et al. Synergistic effect between apolipoprotein E and angiotensinogen gene polymorphisms in the risk for early myocardial infarction. *Clin Chem* 2000;46:1910-5.
361. Rodriguez-Perez JC, Rodriguez-Esparragon F, Hernandez-Perera O, et al. Association of angiotensinogen M235T and A(-6)G gene polymorphisms with coronary heart disease with independence of essential hypertension: the PROCAGENE study. *Prospective Cardiac Gene. J Am Coll Cardiol* 2001;37:1536-42.
362. Niemiec P, Zak I, Wita K. The M235T polymorphism of the AGT gene modifies the risk of coronary artery disease associated with the presence of hypercholesterolemia. *Eur J Epidemiol* 2008;23:349-54.
363. Xu MQ, Ye Z, Hu FB, He L. Quantitative assessment of the effect of angiotensinogen gene polymorphisms on the risk of coronary heart disease. *Circulation* 2007;116:1356-66.
364. Cong ND, Hamaguchi K, Saikawa T, Hara M, Sakata T. A polymorphism of angiotensinogen gene codon 174 and coronary artery disease in Japanese subjects. *Am J Med Sci* 1998;316:339-44.
365. Gardemann A, Stricker J, Humme J, et al. Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;145:309-14.
366. Olivieri O, Stranieri C, Girelli D, et al. Homozygosity for angiotensinogen 235T variant increases the risk of myocardial infarction in patients with multi-vessel coronary artery disease. *J Hypertens* 2001;19:879-84.
367. Lanz JR, Pereira AC, Lemos PA, Martinez E, Krieger JE. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with coronary artery disease severity. *Clin Chim Acta* 2005;362:176-81.
368. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study. *Hum Genet* 1997;99:66-73.
369. Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, et al. Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am J Hum Genet* 1997;60:1448-60.
370. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991;266:15377-83.

371. Swales JD. The renin-angiotensin system as a target for therapeutic intervention. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24 Suppl 2:S1-5.
372. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-6.
373. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992;51:197-205.
374. Nakai K, Itoh C, Miura Y, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 1994;90:2199-202.
375. Sigusch HH, Vogt S, Gruber U, et al. Angiotensin-I-converting enzyme DD genotype is a risk factor of coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:127-32.
376. Cambien F, Costerousse O, Tiret L, et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 1994;90:669-76.
377. Eichner JE, Christiansen VJ, Moore WE, Dunn ST, Schechter E. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in a cohort of coronary angiography patients. *Atherosclerosis* 2001;154:673-9.
378. Ludwig E, Corneli PS, Anderson JL, Marshall HW, Lalouel JM, Ward RH. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis. *Circulation* 1995;91:2120-4.
379. Seckin D, Ilhan N, Ozbay Y. The relationship between ACE insertion/deletion polymorphism and coronary artery disease with or without myocardial infarction. *Clin Biochem* 2006;39:50-4.
380. Friedl W, Krempler F, Paulweber B, Pichler M, Sandhofer F. A deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene is not associated with coronary heart disease in an Austrian population. *Atherosclerosis* 1995;112:137-43.
381. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R, Sorensen TI, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism: ischemic heart disease and longevity in 10,150 individuals. A case-referent and retrospective cohort study based on the Copenhagen City Heart Study. *Circulation* 1997;95:2358-67.
382. Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995;332:706-11.
383. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:484-92.
384. Pfohl M, Koch M, Prescod S, Haase KK, Haring HU, Karsch KR. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. *Eur Heart J* 1999;20:1318-25.
385. Winkelmann BR, Nauck M, Klein B, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with increased plasma angiotensin-converting enzyme activity but not with increased risk for myocardial infarction and coronary artery disease. *Ann Intern Med* 1996;125:19-25.
386. Oei HH, Seyed-Tabatabaei FA, Hofman A, Oudkerk M, van Duijn CM, Witteman JC. The association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and coronary calcification. The Rotterdam Coronary Calcification Study. *Atherosclerosis* 2005;182:169-73.
387. Vassilikioti S, Doumas M, Douma S, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism is not related to essential hypertension in a Greek population. *Am J Hypertens* 1996;9:700-2.

388. Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney Int* 1996;50:1897-903.
389. Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, et al. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 1994;24:37-48.
390. Muller DN, Fischli W, Clozel JP, et al. Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake. *Circ Res* 1998;82:13-20.
391. Frossard PM, Malloy MJ, Lestringant GG, Kane JP. Haplotypes of the human renin gene associated with essential hypertension and stroke. *J Hum Hypertens* 2001;15:49-55.
392. Qi Y, Niu W, Cen W, et al. Strong association of the renin TaqI polymorphism with essential hypertension in Chinese Han and Tibetan populations. *J Hum Hypertens* 2007;21:907-10.
393. Hasimu B, Nakayama T, Mizutani Y, et al. A novel variable number of tandem repeat polymorphism of the renin gene and essential hypertension. *Hypertens Res* 2003;26:473-7.
394. Tsezou A, Karayannis G, Giannatou E, Papanikolaou V, Triposkiadis F. Association of renin-angiotensin system and natriuretic peptide receptor A gene polymorphisms with hypertension in a Hellenic population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2008;9:202-7.
395. Takahashi Y, Nakayama T, Soma M, Izumi Y, Kanmatsuse K. Organization of the human natriuretic peptide receptor A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:736-9.
396. Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E, et al. Atrial natriuretic peptide gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in humans. *Stroke* 2004;35:814-8.
397. Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, et al. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the type A human natriuretic peptide receptor gene and association analysis using a novel microsatellite in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1999;12:1144-8.
398. Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Rehemudula D, Kanmatsuse K, Furuya K. Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese. *Circ Res* 2000;86:841-5.
399. Nakayama T, Soma M, Mizutani Y, et al. A novel missense mutation of exon 3 in the type A human natriuretic peptide receptor gene: possible association with essential hypertension. *Hypertens Res* 2002;25:395-401.
400. Nakayama T, Soma M, Saito S, et al. Missense mutation of exon 3 in the type A human natriuretic peptide receptor gene is associated with myocardial infarction. *Med Sci Monit* 2003;9:CR505-10.
401. Palmer BR, Frampton CM, Richards AM, Cameron VA, Nakayama T. Absence of a NPR-A gene functional deletion allele in a postmyocardial infarction cohort from New Zealand. *Circ Res* 2004;94:e86.
402. Knowles JW, Erickson LM, Guy VK, Sigel CS, Wilder JC, Maeda N. Common variations in noncoding regions of the human natriuretic peptide receptor A gene have quantitative effects. *Hum Genet* 2003;112:62-70.
403. Weber M, Burian M, Dragutinovic I, et al. Genetic polymorphism of the type A human natriuretic peptide receptor (NPR-A) gene contributes to the interindividual variability in the BNP system. *Eur J Heart Fail* 2008;10:482-9.
404. Usami S, Kishimoto I, Saito Y, et al. Association of CT dinucleotide repeat polymorphism in the 5'-flanking region of the guanylyl cyclase (GC)-A gene with essential hypertension in the Japanese. *Hypertens Res* 2008;31:89-96.
405. Rubattu S, Bigatti G, Evangelista A, et al. Association of atrial natriuretic peptide and type a natriuretic peptide receptor gene polymorphisms with left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:499-505.

406. Pepys MB. C-reactive protein and the acute phase response. *Nature* 1982;296:12.
407. Brull DJ, Serrano N, Zito F, et al. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2063-9.
408. Hingorani A, Humphries S. Nature's randomised trials. *Lancet* 2005;366:1906-8.
409. Casas JP, Shah T, Cooper J, et al. Insight into the nature of the CRP-coronary event association using Mendelian randomization. *Int J Epidemiol* 2006;35:922-31.
410. Davey Smith G, Lawlor DA, Harbord R, et al. Association of C-reactive protein with blood pressure and hypertension: life course confounding and mendelian randomization tests of causality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1051-6.
411. Kovacs A, Green F, Hansson LO, et al. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2005;178:193-8.
412. Miller DT, Zee RY, Suk Danik J, et al. Association of common CRP gene variants with CRP levels and cardiovascular events. *Ann Hum Genet* 2005;69:623-38.
413. Kathiresan S, Larson MG, Vasan RS, et al. Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation* 2006;113:1415-23.
414. Kardys I, de Maat MP, Uitterlinden AG, Hofman A, Witteman JC. C-reactive protein gene haplotypes and risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2006;27:1331-7.
415. Lange LA, Carlson CS, Hindorf LA, et al. Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and cardiovascular events. *JAMA* 2006;296:2703-11.
416. Szalai AJ, Alarcon GS, Calvo-Alen J, et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US Cohort (LUMINA). XXX: association between C-reactive protein (CRP) gene polymorphisms and vascular events. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:864-8.
417. Zee RY, Hegener HH, Fernandez-Cruz A, Lindpaintner K. C-reactive protein gene polymorphisms and the incidence of post-angioplasty restenosis. *Atherosclerosis* 2004;176:393-6.
418. Morita A, Nakayama T, Doba N, Hinohara S, Soma M. Polymorphism of the C-reactive protein (CRP) gene is related to serum CRP Level and arterial pulse wave velocity in healthy elderly Japanese. *Hypertens Res* 2006;29:323-31.
419. Zee RY, Ridker PM. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis* 2002;162:217-9.
420. Wang Q, Hunt SC, Xu Q, et al. Association study of CRP gene polymorphisms with serum CRP level and cardiovascular risk in the NHLBI Family Heart Study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2752-7.
421. Saijo Y, Yoshioka E, Fukui T, et al. Effects of the Interaction between Interleukin-6 -634C/G Polymorphism and Smoking on Serum C-Reactive Protein Concentrations. *Hypertens Res* 2007;30:593-9.
422. Eklund C, Nenonen A, Kukkonen-Harjula K, et al. Association of the IL6-174(G/C) polymorphism with C-reactive protein concentration after weight loss in obese men. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:131-5.
423. Eklund C, Jahan F, Pessi T, Lehtimaki T, Hurme M. Interleukin 1B gene polymorphism is associated with baseline C-reactive protein levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw* 2003;14:168-71.

424. Lakka HM, Lakka TA, Rankinen T, et al. The TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with C-reactive protein levels: the HERITAGE Family Study. *Vascul Pharmacol* 2006;44:377-83.
425. Bernardo E, Angiolillo DJ, Ramirez C, et al. Influence of the CD14 C260T promoter polymorphism on C-reactive protein levels in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2006;98:1182-4.
426. Hsieh MC, Hsiao JY, Tien KJ, et al. The association of endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism with C-reactive protein level and metabolic syndrome in a Chinese study group. *Metabolism* 2008;57:1125-9.
427. Gronroos P, Raitakari OT, Kahonen M, et al. Association of high sensitive C-reactive protein with apolipoprotein E polymorphism in children and young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:179-86.
428. Kahri J, Soro-Paavonen A, Ehnholm C, Taskinen MR. ApoE polymorphism is associated with C-reactive protein in low-HDL family members and in normolipidemic subjects. *Mediators Inflamm* 2006;2006:12587.
429. Marz W, Scharnagl H, Hoffmann MM, Boehm BO, Winkelmann BR. The apolipoprotein E polymorphism is associated with circulating C-reactive protein (the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study). *Eur Heart J* 2004;25:2109-19.
430. Hou XW, Wang LF, Wang N, et al. The G501C polymorphism of oxidized LDL receptor gene [OLR-1] is associated with susceptibility and serum C-reactive protein concentration in Chinese essential hypertensives. *Clin Chim Acta* 2008;388:200-3.
431. Tang NP, Wang LS, Yang L, et al. A polymorphism in the resistin gene promoter is related to increased C-reactive protein levels in patients with coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1471-5.
432. Jeng JR. Plasma C-reactive protein and 5-lipoxygenase-activating protein gene promoter poly-A polymorphism in patients with coronary artery disease. *Cardiology* 2008;109:25-32.
433. van Rossum EF, Feelders RA, van den Beld AW, et al. Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am J Med* 2004;117:158-62.
434. Potaczek DP, Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Szczeklik A. The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism may determine an increase in homocysteine levels in fibrate-treated subjects. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006;20:229-32.
435. Dima I, Vlachopoulos C, Alexopoulos N, et al. Association of arterial stiffness with the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in healthy individuals. *Am J Hypertens* 2008;21:1354-8.
436. Morrison AC, Bare LA, Chambless LE, et al. Prediction of coronary heart disease risk using a genetic risk score: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 2007;166:28-35.