

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη του γονιδίου της α_1 -
αντιχυμοτροψίνης σε ασθενείς με
αιμορραγικά αγγειακά εγκεφαλικά
επεισόδια.

ΑΛΜΠΑΝΙΔΟΥ ΠΑΥΛΙΝΑ

Λάρισα 2002

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΡΓΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομ. ... 7/11/2003 ...
Αριθ. Πρωτ. ... 2460 ...



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 1576/1

Ημερ. Εισ.: 31/1/2003

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2002

ΑΛΜ

Μελέτη του γονιδίου της α₁-αντιχυμοτροψίνης σε
ασθενείς με αιμορραγικά αγγειακά εγκεφαλικά
επεισόδια.

Επιβλέπων καθηγητής : Χατζηγεωργίου Γεώργιος

Επιτροπή Αξιολόγησης : Παπαδημητρίου Α.
Χατζηγεωργίου Γ.
Γεωργιάτσου Ε.



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Επιτροπής Αξιολόγησης, τον κ. Α. Παπαδημητρίου, Καθηγητή Νευρολογίας, τον κ. Γ. Χατζηγεωργίου, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας και την κ. Ε. Γεωργάτσου, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας, για την επίβλεψη, υποστήριξη και αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κ. Αγγελάκη και κ. Θ. Δαρδιώτη, ειδικευόμενοι ιατροί Νευρολογίας, για την συμβολή τους στα πειραματικά στάδια της εργασίας, τα οποία πραγματοποιήθηκαν στη Μονάδα Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας και Γενετικής, του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Τέλος, Θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά την οικογένεια μου, για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη, καθώς και τον κ. Γ. Πήττα, MSc, για τις πολύτιμες συμβουλές στην τελική μορφοποίηση της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	2
ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	3

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ.....	5
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΕΕ.....	7
ΕΙΔΗ ΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΕΠΕΙΣΟΔΙΩΝ.....	9
Ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια	
Αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια	
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΕΕ.....	14
Κλινικές γενετικές μελέτες για τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια	
Μοριακή βιολογία των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων	
ΚΑΘΕΨΙΝΗ G.....	26
Λειτουργία	
Δομή	
Α ₁ -ΑΝΤΙΧΥΜΟΤΡΥΨΙΝΗ.....	32
Βιολογική λειτουργία της ACT	

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	40
ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	40
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	42
ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	44
Απομόνωση γενομικού DNA	
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	
Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΑΕΕ) είναι πολυπαραγοντικά νοσήματα και στην αιτιοπαθογένεια τους εμπλέκονται τόσο, περιβαλλοντικοί όσο, και γενετικοί παράγοντες.

Γενετικοί πολυμορφισμοί σε αρκετά ένζυμα έχουν ενοχοποιηθεί σαν προδιαθεσικοί παράγοντες για ΑΕΕ. Η α₁-αντιχυμοτριψίνη (ACT), ανήκει στους αναστολείς της πρωτεάσης της σερίνης και το γονίδιο της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14. Ο πολυμορφισμός -15 Ala/Thr έχει μελετηθεί σε διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα και πρόσφατα βρέθηκε ότι η ομοζυγωτία Thr/Thr στη θέση -15 σχετίζεται θετικά με αιμορραγικά ΑΕΕ.

Είναι γνωστό ότι η συχνότητα γενετικών πολυμορφισμών επηρεάζεται συχνά από το εθνικό υπόβαθρο των υπό μελέτη πληθυσμών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να μελετηθεί για *πρώτη φορά* η γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού -15A/T του γονιδίου της α₁-αντιχυμοτριψίνης (στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος) σε Έλληνες ασθενείς με αιμορραγικό ΑΕΕ.

Μελετήθηκαν 43 ασθενείς με αιμορραγικό ΑΕΕ, οι οποίοι εισήχθησαν διαδοχικά στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, το χρονικό διάστημα από 1/1/2001 έως και 31/3/2002. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR/RFLP για την ανίχνευση του πολυμορφισμού -15Ala/Thr.

Οι άνδρες υπερερούσαν των γυναικών (αναλογία περίπου 2:1) με αιμορραγικό ΑΕΕ. Γνωστοί παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ, όπως είναι η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης βρέθηκαν, όπως ήταν αναμενόμενο, με αυξημένη συχνότητα (72.1% και 27.9% αντίστοιχα) σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Η ηλικία και η κατανομή του φύλου ήταν περίπου η ίδια ανάμεσα στους ασθενείς και στους μάρτυρες.

Η συχνότητα του γονότυπου TT ήταν 23.3 % στους ασθενείς, ενώ στους μάρτυρες ήταν 20.0%. Δεν προχωρήσαμε σε στατιστική των αποτελεσμάτων λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών και των μαρτύρων.

ABSTRACT

Environmental and genetic factors have been implicated in the pathogenesis of stroke, a multifactorial disease. Numerous genetic polymorphisms have been studied and associated with increased risk for stroke. α 1-antichymotrypsin (ACT) is a serine protease inhibitor and located on chromosome 14. The -15Ala/Thr within the ACT gene has been studied in neurodegenerative disorders whilst recently homozygotes ACT-TT were found to have increased risk for hemorrhagic stroke. In humans genetic background influences the frequency of polymorphisms.

PURPOSE: To study, for the first time the distribution of the ACT -15Ala/Thr polymorphism in Greek patients with hemorrhagic stroke.

MATERIALS AND METHODS: Forty-three patients with hemorrhagic stroke were studied. The patients were admitted consecutively at the Larissa University Hospital from 1/1/2001 to 31/3/2002. The ACT -15Ala/Thr polymorphism was investigated using the PCR/RFLP approach.

RESULTS: Patients had an increased frequency of hypertension and diabetes (72.1% and 27.9% respectively) while age and sex were similar compared to controls. The frequency of the genotype ACT-TT was 23.3% in patients and 20.0% in controls. Due to the small sample statistical analysis is inappropriate.

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ΑΕΕ.....Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια

ΕΝΥ.....Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

ΑβΡ.....β Αμυλοειδές πεπτίδιο

ΑCT.....α₁-αντιχυμοτροψίνη

ADAlzheimer Disease

ΑροΕ.....Απολιποπρωτεΐνη Ε

cat G.....Καθεψίνη G

PDParkinson Disease

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ

Η συνεχής αιματική ροή στον εγκέφαλο, που εξαρτάται τόσο από την φυσιολογική καρδιακή λειτουργία, όσο και από την ακεραιότητα και βατότητα των εγκεφαλικών αγγείων, αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την φυσιολογική μεταφορά θρεπτικών ουσιών (κυρίως γλυκόζης) στα νευρικά κύτταρα. Η αιφνίδια ή σταδιακή διακοπή της αιματικής ροής οδηγεί στην εμφάνιση των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων (ΑΕΕ), τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία εστιακής νευρολογικής σημειολογίας (Πίνακας 1), κυρίως με την μορφή διαταραχής της κινητικότητας / αισθητικότητας στα άνω ή / και στα κάτω άκρα, μονόπλευρα ή με την μορφή διαταραχών του λόγου (αφασία).

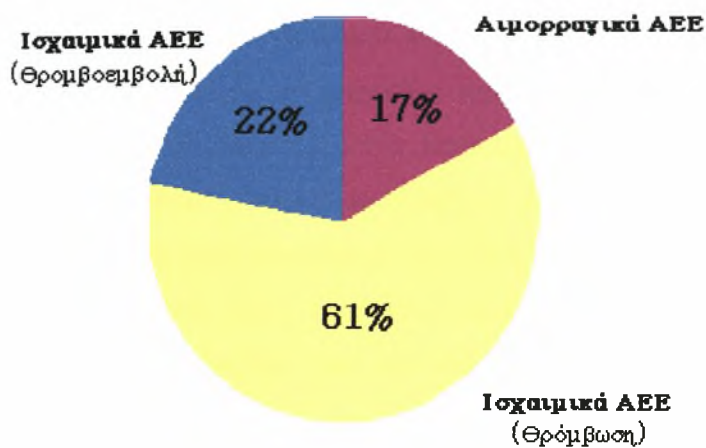
- ο ξαφνική αιμωδία ή αδυναμία του προσώπου, του άνω ή κάτω άκρου, ειδικά σε μια πλευρά του σώματος,
- ο ξαφνική απώλεια όρασης, ιδιαίτερα σε ένα μόνο οφθαλμό,
- ο ξαφνική σύγχυση, πρόβλημα ομιλίας ή κατανόησης του λόγου,
- ο ξαφνικός πονοκέφαλος, χωρίς προφανή αιτία,
- ο απώλεια ισορροπίας, ίλιγγος, πρόβλημα στη βάρδιση και συντονισμού (ειδικά αν συνδέεται με οποιοδήποτε από τα ανωτέρω συμπτώματα).

Πίνακας 1.

Κοινά συμπτώματα των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων (Παπαγεωργίου 1992, Ράπτης 1996).

Τα συμπτώματα αρκετές φορές έχουν διάρκεια λιγότερο από 24 ώρες και αυτό αποτελεί ένδειξη παροδικού ΑΕΕ, αν όμως τα συμπτώματα διαρκούν περισσότερο, τότε το ΑΕΕ χαρακτηρίζεται ως μόνιμο.

Με βάση την ρήξη ή όχι ενός αγγείου, τα ΑΕΕ διαχωρίζονται σε ισχαιμικά (κατάργηση αρτηριακής αιματικής ροής) και αιμορραγικά (ρήξη ενός αρτηριακού κλάδου των εγκεφαλικών αγγείων) που αντιπροσωπεύουν το 83% και 17% αντίστοιχα των ΑΕΕ (Εικόνα 1).



Εικόνα 1.
Σχετική επικράτηση των τύπων των ΑΕΕ.

Τα ΑΕΕ αποτελούν την τρίτη αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες, μετά τις καρδιακές νόσους και τις νεοπλασίες (Ράπτης 1996).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΕΕ

Η ηλικία αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τα ΑΕΕ (Πίνακας 2) και αυτό γιατί τα περισσότερα εγκεφαλικά επεισόδια παρουσιάζονται σε άτομα άνω των 50 ετών (Παπαγεωργίου 1992, Ράπτης 1996). Κατά κανόνα τα ΑΕΕ σε μικρότερες ηλικίες και ειδικότερα σε νέους ή παιδιά υποκρύπτουν σοβαρό γενετικό νόσημα, που προδιαθέτει σε πρόωμη εμφάνιση ισχαιμικού ΑΕΕ (π.χ. ανεπάρκεια πρωτεΐνης C, S και προθρομβίνης) ή σοβαρού τύπου αγγειακή ανωμαλία των εγκεφαλικών αγγείων (π.χ. αρτηριοφλεβώδης δυσπλασία) που εκδηλώνεται συνήθως με την μορφή αιμορραγικού ΑΕΕ.

Η αρτηριακή υπέρταση αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης ΑΕΕ (αύξηση κατά 6 φορές του σχετικού κινδύνου). Οι απότομες μεταβολές της αρτηριακής πίεσης προάγουν την εμφάνιση αιμορραγικών ΑΕΕ, λόγω ρήξης των εγκεφαλικών αρτηριών, ενώ η χρόνια ήπια αρτηριακή υπέρταση προκαλεί κυρίως ισχαιμικού τύπου ΑΕΕ, λόγω μικροαγγειοπάθειας του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) καθώς και γενικευμένης αθηρωμάτωσης.

Ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο από ότι τα φυσιολογικά άτομα για εμφάνιση ΑΕΕ και αυτό διότι και ο διαβήτης προάγει την εμφάνιση αθηρωμάτωσης και μικροαγγειοπάθειας του ΚΝΣ. Παρ' ότι δεν έχει αποδειχθεί ότι η καλή ρύθμιση του διαβήτη μειώνει τον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου, ο έλεγχος της υπεργλυκαιμίας μπορεί να μειώσει το μέγεθος της εγκεφαλικής βλάβης.

Οι καρδιακές νόσοι, κυρίως η κολπική μαρμαρυγή, και οι καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις ενοχοποιούνται σαν προδιαθεσικοί παράγοντες για ΑΕΕ, κυρίως γιατί προάγουν την δημιουργία θρόμβων στις καρδιακές κοιλότητες. Οι θρόμβοι αυτοί είναι συνήθως προσκολλημένοι στις γλωχίνες των βαλβίδων των δεξιών κοιλοτήτων και μπορεί να αποκολληθούν και να οδηγηθούν στις εγκεφαλικές αρτηρίες τις οποίες και αποφράσσουν.

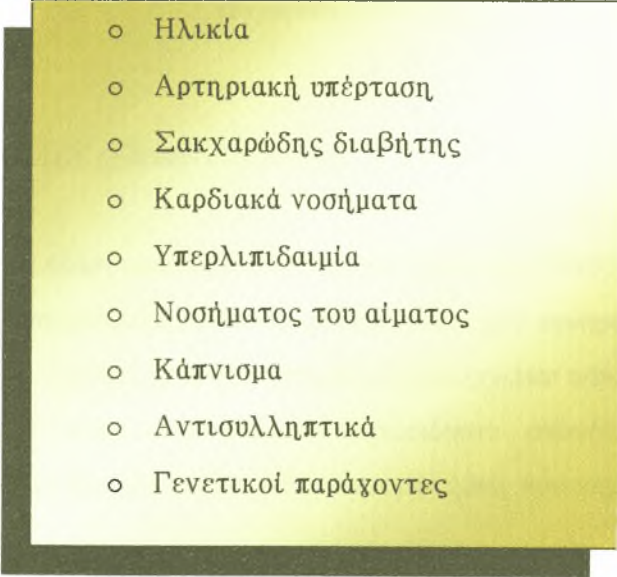
Τα νοσήματα του αίματος και κυρίως η ανεπάρκεια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στους μηχανισμούς πήξεως (όπως η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C, S και θρομβίνης), καθώς και το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο, αποτελούν παράγοντες κινδύνου για ισχαιμικά κυρίως ΑΕΕ. Οι πολύ υψηλές τιμές του αιματοκρίτη μπορεί να ενοχοποιηθούν με συνεργική δράση και άλλων παραγόντων, στην πρόκληση θρομβοεμβολικών επεισοδίων.

Η υπερλιπιδαιμία και κυρίως τα ψηλά επίπεδα χοληστερίνης και LDL, καθώς και χαμηλά επίπεδα των HDL, αποτελούν ισχυρό παράγοντα αθηρωμάτωσης και σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ισχαιμικού ΑΕΕ. Η διατήρηση των λιπιδίων σε φυσιολογικά επίπεδα αποτελεί σημαντικό παράγοντα πρόληψης για ΑΕΕ. Μέχρι σήμερα όμως, δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την επίδραση της αύξησης των τριγλυκεριδίων στην παθογένεια των ΑΕΕ.

Το κάπνισμα έχει ενοχοποιηθεί για πολλές βλαπτικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι καπνιστές έχουν διπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν ισχαιμικό ΑΕΕ, ανεξάρτητα από τη βλαπτική επίδραση του καπνού στα περιφερικά αγγεία και στη καρδιά.

Τα αντισυλληπτικά θεωρούνται από πολλούς ως ένας ακόμα παράγοντας κινδύνου θρομβοεμβολικών επεισοδίων, τόσο στα εγκεφαλικά αγγεία όσο και σε περιφερικά αγγεία.

Οι γενετικοί παράγοντες αποτελούν την τελευταία δεκαετία εκτεταμένο πεδίο έρευνας, με σκοπό να διευκρινιστεί ο βαθμός της συμμετοχής τους στην παθογένεια των ΑΕΕ. Η έρευνα της μοριακής βιολογίας έχει δύο κατευθύνσεις : α) την αναζήτηση των παθογόνων γονιδίων που προάγουν την εμφάνιση ΑΕΕ σε περιπτώσεις κληρονομικών μορφών ΑΕΕ, και β) την ανίχνευση γενετικών πολυμορφισμών στο ανθρώπινο γονιδίωμα που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ στο γενικό πληθυσμό.

- 
- Ηλικία
 - Αρτηριακή υπέρταση
 - Σακχαρώδης διαβήτης
 - Καρδιακά νοσήματα
 - Υπερλιπιδαιμία
 - Νοσήματος του αίματος
 - Κάπνισμα
 - Αντισυλληπτικά
 - Γενετικοί παράγοντες

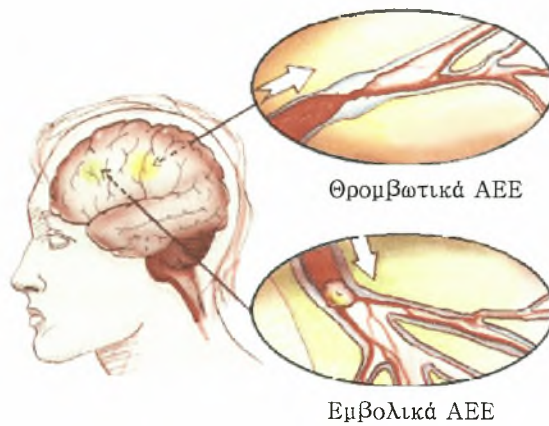
Πίνακας 2.
Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση ΑΕΕ.

ΕΙΔΗ ΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΕΠΕΙΣΟΔΙΩΝ

Όπως έχει προαναφερθεί, με βάση το είδος της βλάβης, τα ΑΕΕ διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα ισχαιμικά και τα αιμορραγικά (Παπαγεωργίου 1992, Stanford University 1999, Ράπτης 1996).

1. Ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια

Προκαλούνται από απόφραξη ενός μικρού ή μεγάλου αρτηριακού κλάδου των αγγείων του ΚΝΣ και με βάση την παθογένεια τους διακρίνονται σε θρομβωτικά και εμβολικά (Εικόνα 2).



Εικόνα 2.
Ισχαιμικά ΑΕΕ.

■ Θρομβωτικά ΑΕΕ (*Thrombotic stroke*)

Είναι οι πιο κοινοί τύποι επεισοδίων (Stanford University 1999) και σε αυτόν, ένας θρόμβος αίματος σχηματίζεται μέσα σε μια αρτηρία του εγκεφάλου και εμποδίζει την ροή του αίματος. Μερικές φορές ο θρόμβος δημιουργείται πάνω σε αθηρωματικές πλάκες, που αναπτύσσονται σε αρτηρίες του καρωτιδικού - σπονδυλικού συστήματος. Η εγκατάσταση των θρομβωτικών ΑΕΕ είναι συνήθως προοδευτική (σε διάστημα λίγων ωρών).

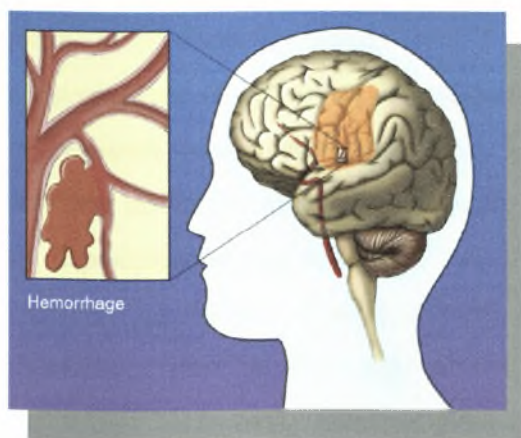
■ Εμβολικά ΑΕΕ (*Embolic stroke*)

Προκαλούνται επίσης από έναν θρόμβο, σε αντίθεση όμως από την εγκεφαλική θρόμβωση, ο θρόμβος δημιουργείται κάπου εκτός του εγκεφάλου (συνήθως στις αριστερές καρδιακές κοιλότητες). Εμφανίζονται όταν αποκολλάται ένα τμήμα του θρόμβου και μεταφέρεται από τη ροή του αίματος στον εγκέφαλο (American Academy of Neurology 2001). Μετακινούμενος μέσω των αρτηριών που διακλαδίζονται σε μικρότερα αγγεία, ο θρόμβος φθάνει σε ένα σημείο, όπου δεν μπορεί να προχωρήσει περισσότερο, κόβοντας τον ανεφοδιασμό του αίματος. Αυτή η ξαφνική παρεμπόδιση καλείται εμβολή. Τα εμβολικά επεισόδια εμφανίζουν συνήθως αιφνίδια έναρξη.

II. Αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια

Αποτελούν την δεύτερη βασική κατηγορία ΑΕΕ (Παπαγεωργίου 1992, Stanford University 1999) και χαρακτηρίζονται από την ρήξη ενός ενδοεγκεφαλικού αγγείου απελευθερώνοντας αίμα στον εγκέφαλο ή στην περιοχή που τον περιβάλλει. Όταν αυτό συμβεί, τα κύτταρα που τρέφονται από την αρτηρία, δεν έχουν κανονικό ανεφοδιασμό θρεπτικών ουσιών και νεκρώνονται (Εικόνα 3).

Επιπλέον, το συσσωρευμένο αίμα μετά την ρήξη της αρτηρίας πήζει σύντομα, μετατοπίζοντας τον εγκεφαλικό ιστό εμποδίζοντας την λειτουργία του εγκεφάλου (εμφάνιση εγκεφαλικού οιδήματος).



Εικόνα 3.
Αιμορραγικά ΑΕΕ.

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι αιμορραγικών επεισοδίων:

■ *Υπαραχνοειδής αιμορραγία (Subarachnoid Hemorrhage -- SAH)*

Χαρακτηρίζεται (Παπαγεωργίου 1992) από την παρουσία αίματος στον υπαραχνοειδή χώρο. Η αυτόματος υπαραχνοειδής αιμορραγία είναι αρκετά συχνή και αντιπροσωπεύει το 2% περίπου του συνόλου των αγγειακών παθήσεων του εγκεφάλου και το 10% περίπου των θανάτων από ΑΕΕ ποικίλης αιτιολογίας.

Το μισό των θανάτων αφορά άτομα ηλικίας κάτω των 45 ετών. Γενικά η νόσος παρουσιάζεται με συχνότητα 10-15 περιπτώσεις το έτος, ανά 100.000 κατοίκους.

Κύρια αιτία αποτελεί η ρήξη αρτηριακού ανευρύσματος (55%) ή αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας (5-6%). Η αρτηριακή υπέρταση και η αρτηριοσκλήρυνση ενοχοποιούνται σε ποσοστό 12%, ενώ άλλες αιτίες (6-7%) αποτελούν όγκοι που αιμορράγησαν, αιμορραγική προδιάθεση, λήψη αντιπηκτικών, αγγειοπάθεια γενικευμένου συστηματικού νοσήματος όπως ο ερυθματώδης λύκος κ.α. Σ' αυτές όμως τις περιπτώσεις η αιμορραγία εμφανίζει και ενδοεγκεφαλική επέκταση. Ποσοστό 20% περίπου είναι αγνώστου αιτιολογίας .

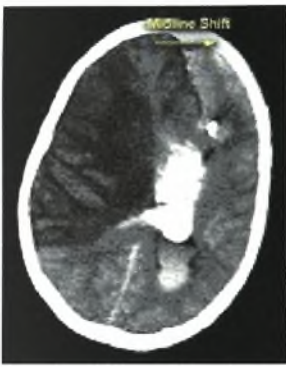
Η εγκατάσταση του επεισοδίου είναι συνήθως αιφνίδια και στο 1/3 των περιπτώσεων η αιμορραγία συμβαίνει κατά την διάρκεια του ύπνου. Η βαρύτητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από το μέγεθος της αιμορραγίας. Κεφαλαλγία και διαταραχή της συνειδήσεως κυριαρχούν στην κλινική εικόνα.

Σε βαρείες περιπτώσεις επέρχεται άμεση απώλεια της συνειδήσεως, με πτώση του ασθενούς στο έδαφος και εγκατάσταση κώματος ποικίλης βαρύτητας, ενώ είναι δυνατόν να εμφανισθούν και επιληπτικές κρίσεις.

Η διάγνωση της υπαραχνοειδούς αιμορραγίας στηρίζεται στην κλινική εικόνα και επιβεβαιώνεται με την αξονική τομογραφία εγκεφάλου. Μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο το 1/4 περίπου των ασθενών, παρά την βελτίωση τα τελευταία χρόνια των διαγνωστικών και των θεραπευτικών παρεμβάσεων.

Το ψηλό ποσοστό θανάτου αποδίδεται στην εμφάνιση επιπλοκών, όπως είναι ο γενικευμένος αγγειόσπασμος των αγγείων του ΚΝΣ, που οδηγεί σε μόνιμη εγκεφαλική ισχαιμία. Άλλες επιπλοκές είναι ο υδροκέφαλος και το διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.

Η θεραπεία αρχικά είναι συντηρητική, για παράδειγμα χορήγηση αποιδηματικών και αγγειοδιασταλτικών ουσιών, για την αντιμετώπιση του εγκεφαλικού οιδήματος και του αγγειόσπασμου. Σε περίπτωση που η νόσος οφείλεται σε ρήξη ανευρύσματος ή αγγειακή δυσπλασία, τότε η οριστική αντιμετώπιση γίνεται με χειρουργική αντιμετώπιση.



Εικόνα 4.
Αξονική τομογραφία εγκεφάλου όπου
συνυπάρχουν ισχαιμικά και αιμορραγικά στοιχεία.

■ *Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (Intracerebral Hemorrhage -- ICH)*

Χαρακτηρίζεται από έκχυση αίματος μέσα στην εγκεφαλική ουσία, σε αντίθεση με την υπαραχνοειδή αιμορραγία, όπου η αιμορραγία περιορίζεται στον υπαραχνοειδή χώρο (Εικόνα 5).

Αν και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία εντούτοις εμφανίζει αυξημένη συχνότητα σε άτομα άνω των 40 χρονών που πάσχουν από αρτηριακή υπέρταση, η οποία δεν είναι καλά ρυθμισμένη. Εμφανίζεται συχνότερα σε άνδρες και είναι βασική αιτία θανάτου (20-25%).

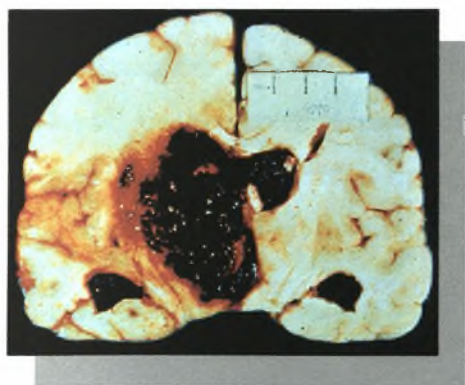
Στην πλειοψηφία των ασθενών η αιμορραγία συμβαίνει στην περιοχή των βασικών γαγγλίων. Βασικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην συχνότερη εμφάνιση της αιμορραγίας στην πιο πάνω περιοχή δεν είναι γνωστοί. Πιθανολογείται ότι σε αυτή την περιοχή προκαλούνται οι σοβαρότερες διαταραχές των τοιχωμάτων των αρτηριών, σαν αποτέλεσμα της αρτηριακής υπέρτασης.

Επιπλέον κατά την απότομη αύξηση της αρτηριακής πίεσης, παραμένει αυξημένη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην περιοχή των βασικών γαγγλίων, σε σχέση με άλλες περιοχές του εγκεφάλου και ειδικότερα στις περιφερικές αρτηρίες των άκρων, στις οποίες η αυτορύθμιση επαναφέρει την αρτηριακή πίεση στα φυσιολογικά επίπεδα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Σπανιότερες αιτίες της εγκεφαλικής αιμορραγίας, ανεξάρτητα της θέσεως της, είναι η αμυλοειδική αγγειοπάθεια, οι λοιμώξεις ή τα συστηματικά νοσήματα (όπως του κολλαγόνου), οι αιματολογικές παθήσεις (λευχαιμία, θρομβοπενική πορφύρα) καθώς και οι αιμορραγίες υπαρχόντων νεοπλασμάτων ή περιοχών με μεταστατικές εστίες.

Η εγκατάσταση της εγκεφαλικής αιμορραγίας των βασικών γαγγλίων συμβαίνει αιφνίδια κατά την διάρκεια της ημέρας. Συνήθως συμβαίνει, είτε κατά την απότομη αύξηση της αρτηριακής πίεσης, είτε κατά την διάρκεια έντονης σωματικής προσπάθειας. Εκδηλώνεται με την εμφάνιση κυρίως ημιπάρεσης, καθώς με και διαταραχή του επιπέδου της συνειδήσεως.

Η αιμορραγία που συμβαίνει στην κεντρική λευκή ουσία των ημισφαιρίων (ενδοημισφαιρική αιμορραγία), διαφέρει ως προς την βαρύτητα, αλλά και ως προς την αιτιολογία του. Οφείλεται συνήθως, σε ρήξη αγγείων εντός της λευκής ουσίας, λόγω προϋπάρχοντος αρτηριακού ανευρύσματος ή αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας και σπανιότερα σε ρήξη αγγείου από εξωτερικό τραυματισμό.



Εικόνα 5.

Τομή εγκεφάλου που φαίνεται η έκταση της αιμορραγίας.

Η κλινική εικόνα εξαρτάται από την θέση της αιμορραγίας και δυνητικά μπορεί να εμφανιστεί με όλους τους συνδυασμούς νευρολογικής σημειολογίας. Συχνό φαινόμενο στις περιπτώσεις ενδοεγκεφαλικών αιμορραγιών είναι η ανάπτυξη οιδήματος, γύρω από την περιοχή της αιμορραγίας, μερικές μέρες μετά την εμφάνισή του. Η αξονική τομογραφία αναδεικνύει σε μεγάλο βαθμό την ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.

Η αντιμετώπιση της βαρείας εγκεφαλικής αιμορραγίας είναι συντηρητική και αφορά την υποστήριξη των ζωτικών λειτουργιών του ασθενούς, καθώς και τη χορήγηση αποιδηματικών ουσιών, όπως είναι η μαννιτόλη. Όταν η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία βρίσκεται σε προσπελάσιμη περιοχή και ασκεί πιεστικά φαινόμενα στην εγκεφαλική ουσία, τότε η χειρουργική αποσυμπίεση είναι απαραίτητη.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΕΕ

Είναι παγιωμένη επιστημονική άποψη, εδώ και αρκετές δεκαετίες, ότι τα ΑΕΕ αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυπαραγοντικού νοσήματος (Rastenyte 1998), δηλαδή νοσήματος στην παθογένεια του οποίου εμπλέκονται πολλοί περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες. Αν και οι γενετικοί παράγοντες δεν μπορούσαν μέχρι πρόσφατα να αποδειχθούν με σαφήνεια, εν τούτοις, η επανάσταση της μοριακής βιολογίας την τελευταία δεκαετία επιβεβαίωσε τον σημαντικό ρόλο τους στην παθογένεια των ΑΕΕ. Επιπλέον επιβεβαίωσε την σημαντική γενετική ετερογένεια των ΑΕΕ.

Η αθηρωμάτωση, όπως έχει αναφερθεί, αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση των ΑΕΕ. Σήμερα αρκετά από τα γονίδια που συμμετέχουν στην σύνθεση των λιπιδίων, που εμπλέκονται στην εμφάνιση της αθηρωμάτωσης, έχουν χαρτογραφηθεί και είναι γνωστή η αλληλουχία των βάσεων τους. Γι' αυτό και αποτέλεσαν έναν από τους αρχικούς στόχους των γενετικών μελετών, στην προσπάθεια να καθοριστεί η γενετική βάση της αυξημένης συχνότητας ΑΕΕ, σε ασθενείς με οικογενείς δυσλιπιδαιμίες. Έτσι γνωρίζουμε την γενετική βάση της οικογενούς υπερχολιστεριναιμίας, της οικογενούς α-λιποπρωτεϊναιμίας, της υπερλιπιδαιμίας τύπου II και IV, κα.

Η αρτηριακή υπέρταση αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ΑΕΕ και είναι γνωστό, ότι για την εμφάνισή της σημαντικό ρόλο έχει η κληρονομικότητα. Γι' αυτό και πιθανολογείται ότι οι ίδιοι γενετικοί παράγοντες (άγνωστοι μέχρι σήμερα) που εμπλέκονται στην παθογένεια της, πρέπει να ενοχοποιηθούν και για μερικές μορφές ΑΕΕ.

Γενετικές διαταραχές (Παπαδημητρίου 2002) των αιμοστατικών παραγόντων (όπως η πρωτεΐνη C, S και αντιθρομβίνη III), φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό αιτιοπαθογενετικό ρόλο στην εμφάνιση ΑΕΕ, ιδιαίτερα σε μικρές ηλικίες.

Οριστική απάντηση στο ερώτημα, στο κατά πόσον η διαταραχή ενός και μόνο γονιδίου, μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση κληρονομικών μορφών ΑΕΕ, δόθηκε το 1996 (Orhoff), όταν περιγράφηκαν οι πρώτες μεταλλάξεις στο γονίδιο *Notch-3* σε οικογένειες με το σύνδρομο CADASIL, το οποίο χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ΑΕΕ και άνοιας.

1. Κλινικές γενετικές μελέτες για τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια

Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1990 οι ενδείξεις για την συμμετοχή γενετικών παραγόντων στην παθογένεια των ΑΕΕ ήταν έμμεσες (Rastenyte 1998) και προέρχονταν κυρίως από τρία είδη μελετών: α) τις μελέτες διδύμων, β) τις μελέτες οικογενειών και γ) συγκριτικές μελέτες σε διαφορετικούς εθνολογικά πληθυσμούς.

✦ *Μελέτες σε διδύμους*

Η ισχυρότερη ένδειξη για την συμμετοχή γενετικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένεια των ΑΕΕ προέρχεται από τις μελέτες των διδύμων (Rastenyte 1998). Οι μελέτες αυτές στηρίζονται στην γνωστή γενετική διαφορά των μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων, δηλαδή στο ότι οι μονοζυγωτικοί δίδυμοι έχουν 100% πανομοιότυπο DNA, ενώ οι διζυγωτικοί δίδυμοι έχουν όμοιο DNA μόνο στο 50%, όσο δηλαδή και δύο αδέρφια που δεν είναι δίδυμα.

Αυτό πρακτικά σημαίνει, ότι αν ένα νόσημα είναι αποκλειστικά γενετικό και κληρονομείται με αυτοσωματικό επικρατή τρόπο, τότε ο δίδυμος αδελφός ενός μονοζυγωτικού ασθενή θα πάσχει 100%, ενώ αυτός ενός διζυγωτικού ασθενή θα πάσχει με πιθανότητα 50%.

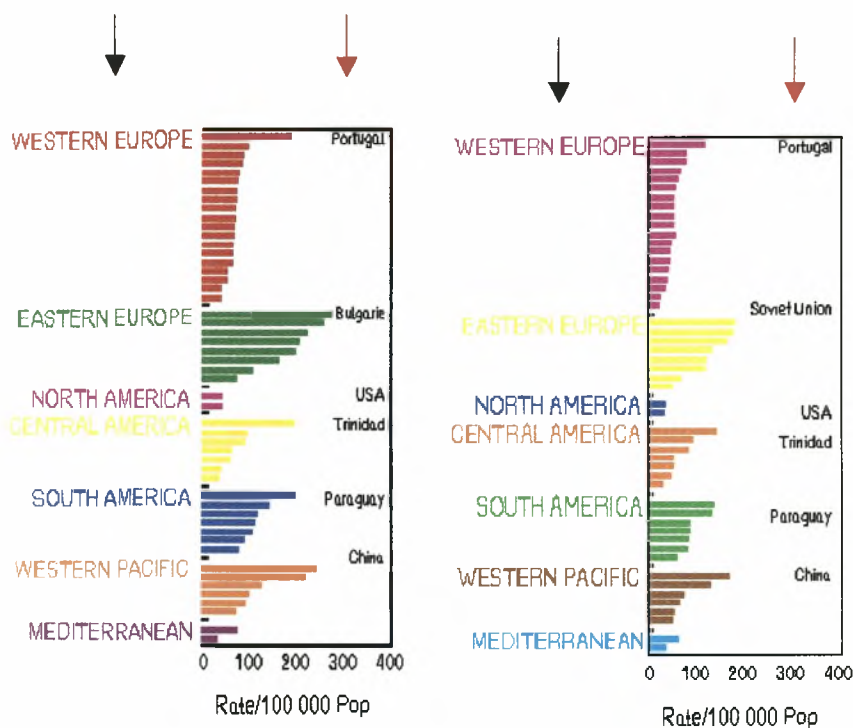
Στις μελέτες με διδύμους υπολογίζεται η "συμφωνία" (concordance) με την οποία πάσχουν και οι δύο δίδυμοι. Θεωρητικά αν ένα νόσημα είναι αμιγώς γενετικό τότε, η συμφωνία των μονοζυγωτικών διδύμων θα είναι 100%, ενώ των διζυγωτικών θα είναι 50%. Αντιθέτως, αν ένα νόσημα οφείλεται αποκλειστικά σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, τότε η συμφωνία δεν θα διαφέρει ανάμεσα στους μονοζυγωτικούς και διζυγωτικούς διδύμους.

Όσο περισσότεροι γενετικοί παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεια ενός νοσήματος, τόσο μεγαλύτερος γίνεται ο βαθμός συμφωνίας των μονοζυγωτικών σε σχέση με τους διζυγωτικούς διδύμους. Η πλέον τεκμηριωμένη μελέτη, δημοσιεύτηκε το 1992 και επαναβεβαιώθηκε το 1998 με προοπτική μελέτη όπου τεκμηριώθηκε η γενετική βάση των ΑΕΕ (Brass 1992, 1998). Επιπλέον, αναδείχθηκε και ο σημαντικός ρόλος των περιβαλλοντικών παραγόντων.

■ Μελέτες σε οικογένειες

Οι συστηματικές επιδημιολογικές μελέτες σε οικογένειες στο Framingham της Αμερικής, ανέδειξαν τον σημαντικό ρόλο της κληρονομικότητας στην παθογένεια των ΑΕΕ. Το 1993 (Kiely 1993) βρέθηκε ότι τα παιδιά με γονείς με ιστορικό ΑΕΕ, είχαν αυξημένο κίνδυνο (2-3 φορές μεγαλύτερο) εμφάνισης ΑΕΕ, σε σχέση με τα παιδιά γονέων που δεν είχαν ιστορικό ΑΕΕ, επιβεβαιώνοντας έτσι παλαιότερες μελέτες άλλης ερευνητικής ομάδας, που συμπέραναν ότι η παρουσία θετικού οικογενειακού ιστορικού αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ΑΕΕ (Khaw 1986).

Πρόσφατα μελέτη οικογενειών κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η γενετική συμμετοχή στα ΑΕΕ διαφέρει ανάλογα με το είδος του ΑΕΕ και το φύλο (Εικόνα 6) (Rastenytė 1998, Jousilahti 1997).



Εικόνα 6. Στατιστικές μελέτες Θνησιμότητας.

Ποσοστά Θανάτων από ΑΕΕ, ανδρών (αριστερά) και γυναικών (δεξιά) ηλικίας 35-74 ανά χώρα, τα έτη 1984 - 1990. Το μαύρο βέλος υποδεικνύει την γεωγραφική περιοχή όπου έγινε η μελέτη και το κόκκινο βέλος την χώρα με την μεγαλύτερη συχνότητα (Thom 1993).

Ενδιαφέρον, όμως παρουσιάζει και η παρατήρηση ότι ο βαθμός αθηρωμάτωσης των ενδοεγκεφαλικών αγγείων είναι μεγαλύτερος στους μαύρους, ενώ στους λευκούς παρατηρείται συχνότερα σε εξωκρανικά αγγεία (καρωτιδικό και σπονδυλοβασικό σύστημα) (Alter 1994).

Τα πιο πάνω αποτελούν έμμεσες, αλλά σαφείς ενδείξεις, ότι διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο των εθνολογικών πληθυσμών, ενδεχομένως συμβάλλουν στην διαφορά της συχνότητας των ΑΕΕ. Δεν έχει αποκλειστεί όμως ακόμα, αν οι παρατηρήσεις αυτές απλά αντανακλούν διαφορετικές διατροφικές συνήθειες ή διαφορετικό τρόπο ζωής.

II. Μοριακή βιολογία των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων

Η μελέτη των ΑΕΕ σε επίπεδο μοριακής βιολογίας έχει δύο κατευθύνσεις :

α) τη σύνδεση των οικογενειών των πασχόντων με τη χρωμοσωμιακή γενετική περιοχή (gene locus) και στην συνέχεια την εντόπιση και ανίχνευση της αλληλουχίας βάσεων (sequencing) του υπεύθυνου γονιδίου, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η παρουσία παθογόνων μεταλλάξεων και

β) την ανίχνευση των γενετικών πολυμορφισμών (μη παθογόνων αλλαγών μίας η περισσότερων νουκλεοτιδικών βάσεων στο γονίδιο), που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ. Οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορεί να επιταχύνουν, επιβραδύνουν ή να τροποποιήσουν την κλινική έκφραση των ΑΕΕ ή απλά να βρίσκονται πολύ κοντά στο άγνωστο ακόμα παθογόνο γονίδιο και η συσχέτιση που παρατηρούμε να είναι δευτερογενής.

■ Αναζήτηση παθογόνων γονιδίων που προκαλούν κληρονομικές μορφές ΑΕΕ

Η εντόπιση των παθογόνων γονιδίων που προκαλούν, είτε από μόνα τους κληρονομικές μορφές ΑΕΕ, είτε σύνδρομα που περιλαμβάνουν στην συμπτωματολογία τους και ΑΕΕ, αποτέλεσε σημαντικό βήμα στην κατανόηση της γενετικής βάσης τους.

Τα γονίδια αυτά θα μπορούσαμε να τα χωρίσουμε σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το είδος του ΑΕΕ, δηλαδή σε γονίδια που συνδέονται με ισχαιμικού ή αιμορραγικού τύπου ΑΕΕ. Αναφέρονται ενδεικτικά μερικά από τα γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεια των ΑΕΕ.

▪ Γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεια των ισχαιμικών ΑΕΕ.

α. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *Notch-3*

Το 1993 το ακρωνύμιο CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy) χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει ένα κληρονομικό νόσημα που χαρακτηριζόταν από την εμφάνιση πολλαπλών ΑΕΕ σε μέση ηλικία (40-50 έτη), από ημικρανία (η οποία μπορεί να προηγηθεί συνήθως και μια δεκαετία από την εμφάνιση των ΑΕΕ), από επιληψία και πρώιμες διαταραχές της ψυχικής σφαίρας (Tournier-Lasserre 1993). Μερικά χρόνια μετά την εμφάνιση της νόσου, οι ασθενείς με το σύνδρομο CADASIL, εμφανίζουν αγγειακή άνοια.

Το νόσημα αυτό θεωρήθηκε σπάνιο, αλλά σήμερα έχει περιγραφεί σε αρκετές οικογένειες σε ολόκληρο τον κόσμο (Markus 2002). Κληρονομείται με αυτοσωματικό επικρατή τρόπο και το υπεύθυνο γονίδιο *Notch-3* εντοπίστηκε αρχικά στο χρωμόσωμα 19q12 (Tournier-Lasserre 1993) και τρία χρόνια αργότερα περιγράφηκαν οι πρώτες σημειακές μεταλλάξεις (Joutel 1996).

Η νόσος θεωρείται σαν γενικευμένη μη αρτηριοσκληρωτική μη αμυλοειδική αρτηριοπάθεια του μέσου χιτώνα των εγκεφαλικών αρτηριών. Χαρακτηριστικές αλλοιώσεις του μέσου χιτώνα ανευρίσκονται και στη βιοψία δέρματος, οι οποίες χαρακτηρίζονται από συσσώρευση, αγνώστου προέλευσης, κοκκιώδους υλικού. Χαρακτηριστικά επίσης είναι και τα ευρήματα της μαγνητικής τομογραφίας εγκεφάλου, που αναδεικνύουν γενικευμένη εγκεφαλοπάθεια, με παρουσία πολλαπλών μικρών ΑΕΕ.

Το γονίδιο *Notch-3* κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη (2321 αμινοξέων), η οποία συμμετέχει στην οδό σηματοδότησης των κυττάρων (signaling pathway) και στις αναπτυξιακές λειτουργίες των κυττάρων (Artavanis-Tsakonas 1995). Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί αρκετές μεταλλάξεις, το μεγαλύτερο ποσοστό από τις οποίες εντοπίζονται στα εξόνια 3-6 (Markus 2002).

β. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CACNA1A*

Το *CACNA1A* βρίσκεται πολύ κοντά στο *Notch-3* στο χρωμόσωμα 19p13 και κωδικοποιεί την α₁ υποομάδα των ιοντικών διαύλων Ca⁺⁺ (Joutel 1993, Ophoff 1996) και σήμερα γνωρίζουμε ότι τις μεταλλάξεις σε αυτό προκαλούν τρία νοσήματα:

- α) η οικογενής ημικρανική ημικρανία,
- β) η επεισοδιακή αταξία τύπου II και
- γ) η νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία τύπου VI (Kullmann 2002).

Η οικογενής ημιπληγική ημικρανία είναι μία σπάνια μορφή ημικρανίας, με σαφή αυτοσωματικό επικρατητικό τρόπο κληρονομικότητας. Σε 50% περίπου των οικογενειών έχουν ανεβρεθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *CACNA1A* γεγονός που υποδηλώνει ότι τουλάχιστον άλλο ένα γονίδιο είναι υπεύθυνο γι' αυτό το νόσημα.

Η νόσος χαρακτηρίζεται από παροξυσμική εμφάνιση παροδικών ΑΕΕ, λόγω παροδικής ισχαιμίας του εγκεφάλου, με την μορφή ημιπάρεσης. Συνήθως τα συμπτώματα, προηγούνται της εμφάνισης του ημικρανικού πόνου και υποχωρούν στην συνέχεια. Μετά από επαναλαμβανόμενα επεισόδια παραμένει, συνήθως μόνιμη παρεγκεφαλιδική διαταραχή. Επιπλέον, οι ασθενείς αυτοί έχει βρεθεί ότι έχουν αυξημένο κίνδυνο μόνιμου ΑΕΕ.

γ. Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (*tRNA^{Leu(UR)}*)

Γενετικές βλάβες στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) προκαλούν συνήθως πολυσυστηματικά νοσήματα και χαρακτηρίζονται σε αρκετές περιπτώσεις από την παρουσία ενός είδους κληρονομικότητας, που δεν ακολουθεί του κανόνες του Mendel, της μητρικής κληρονομικότητας.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί αρκετά σύνδρομα που οφείλονται σε γενετική βλάβη του mtDNA και φέρονται υπό τον τίτλο μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες (DiMauro 2001).

Το σύνδρομο MELAS (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke like episodes) εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά και είναι από τα πρώτα σύνδρομα που περιγράφηκε. Εκτός από την παρουσία κλινικών σημείων εγκεφαλοπάθειας και μυοπάθειας που χαρακτηρίζουν αυτό το σύνδρομο, για την τεκμηρίωσή του είναι απαραίτητη και η παρουσία χαρακτηριστικών βλαβών στο εγέφαλο που προσομοιάζουν με ισχαιμικά ΑΕΕ (κλινικά και απεικονιστικά).

Το χαρακτηριστικό απεικονιστικό εύρημα στην αξονική τομογραφία είναι ότι αυτές οι ισχαιμικές περιοχές δεν ακολουθούν συγκεκριμένη περιοχή άρδευσης, από κάποιο συγκεκριμένο αγγείο και έχουν αποδοθεί σε διαταραχή των μιτοχονδρίων των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων του εγκεφάλου.

Το σύνδρομο MELAS οφείλεται, στην πλειοψηφία των ασθενών, σε σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *tRNA^{Leu(UR)}* του mtDNA. Η μετάλλαξη A3243G είναι η πιο συχνή και πρέπει να αναζητείται σε όλα τα παιδιά που πάσχουν από ισχαιμικό ΑΕΕ και δεν υπάρχουν εμφανείς προδιαθεσικοί παράγοντες στο ιστορικό τους.

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των μεταλλαγών στο γονίδιο γονίδιο $tRNA^{Leu(UUR)}$, είναι η μεγάλη κλινική ετερογένεια (Hadjigeorgiou 1999).

δ. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της β -συνθετάσης της κυσταθειονίνης

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της β -συνθετάσης της κυσταθειονίνης (Kraus 1998), η οποία χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα την ομοκυστεΐνη, αποτελεί την συχνότερη μορφή συγγενούς ομοκυστινουρίας, η οποία κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο και αποτελεί σοβαρό παράγοντα ΑΕΕ στα παιδιά, γιατί προάγει την εμφάνιση πρώιμης αθηρωμάτωσης. Εμφανίζεται με συχνότητα 1/100.000 γεννήσεις και συνήθως οδηγεί σε αύξηση της ομοκυστεΐνης 40 φορές πάνω από τα φυσιολογικά όρια.

Η νόσος οφείλεται σε ομόζυγες ή συνδυασμένες ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο της β -συνθετάσης της κυσταθειονίνης (21q22.3) και μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 60 μεταλλάξεις με συχνότερες τις I278T και G307S. Οι ετεροζυγώτες εμφανίζονται με συχνότητα περίπου 1/150 στο γενικό πληθυσμό και έχουν συνήθως φυσιολογικές ή ελαφρώς αυξημένες τιμές ομοκυστεΐνης αίματος, αλλά δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα αυξημένος κίνδυνος για αρτηριοθρομβωτικά επεισόδια σε αυτούς.

▪ Γονίδια που σχετίζονται με την παθολογία των αιμορραγικών ΑΕΕ

Οι μελέτες μοριακής βιολογίας που σχετίζονται με αιμορραγικά ΑΕΕ, αφορούν σχεδόν αποκλειστικά την μελέτη δύο κατηγοριών νοσημάτων:

- α) της ετερογενούς, γενετικά και κλινικά, ομάδας νοσημάτων που φέρονται με τον τίτλο εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια και
- β) της ομάδας των εγκεφαλικών αγγειακών δυσπλασιών.

α. Εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια

Είναι παθολογοανατομική περιγραφή αγγειοπάθειας του εγκεφάλου, που χαρακτηρίζεται από παθολογική εναπόθεση αμυλοειδούς στους χιτώνες των αγγείων, με αποτέλεσμα να τα καθιστούν ευάλωτα σε ρήξη (Kalaria 2001).

Αν και αποτελεί συχνό εύρημα σε αρκετά σποραδικά εκφυλιστικά νοσήματα του ΚΝΣ, εν τούτοις σήμερα είναι γνωστό ότι υπάρχουν και οικογενείς μορφές της νόσου, που χαρακτηρίζονται από συχνά επεισόδια ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας και ανάπτυξη ανοϊκής συνδρομής.

Σήμερα είναι γνωστά 6 γονίδια, τα *cystatin C*, *AβPP*, *gelsolin*, *TTR*, *BRI* και *PRNP*, που προκαλούν την νόσο, τονίζοντας έτσι την γενετική ετερογένεια της. Το πρώτο γονίδιο που ενοχοποιήθηκε για οικογενή μορφή της εγκεφαλικής αμυλοειδικής αγγειοπάθειας, ήταν το γονίδιο της *cystatin C* στο χρωμόσωμα 20.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός, ότι βρέθηκαν μεταλλάξεις στην πρόδρομη ουσία του αμυλοειδούς (*AβPP*) στο χρωμόσωμα 21, αφού όπως είναι γνωστό μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό προκαλούν οικογενείς μορφές νόσου Alzheimer.

Μελέτη μεγάλης βρετανικής οικογένειας, 200 ατόμων, οδήγησε στην ανακάλυψη παθογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRI* στο χρωμόσωμα 13. Επιπλέον έχουν αναγνωριστεί παθογόνες μεταλλάξεις και σε δύο άλλα γονίδια, *TTR* και *PrnP*, των οποίων όμως οι κλινικές εκδηλώσεις δεν χαρακτηρίζονται συνήθως από εγκεφαλική αιμορραγία παρά μόνο περιστασιακά.

Η οικογενής αμυλοείδωση που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της τρανσθυρετίνης (*transthyretin - TTR*) χαρακτηρίζεται συνήθως από περιφερική νευροπάθεια. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί δύο οικογένειες με εγκεφαλική οικογενή αμυλοείδωση με μεταλλάξεις στο γονίδιο *TTR*.

Παθολογικές ισομορφές της πρωτεΐνης prion-*PrnP*, ανευρίσκονται στις σποραδικές και ιατρογενής μορφές της νόσου Creutzfeldt-Jakob, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης prion έχουν περιγραφεί στη νόσο Gerstmann–Straüssler–Scheinker. Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί μία οικογένεια με εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια με παθογόνα μετάλλαξη στο γονίδιο *PrnP*.

β. Εγκεφαλικές αγγειακές δυσπλασίες

Πρόσφατες γενετικές μελέτες μοριακής βιολογίας των αγγειακών δυσπλασιών του εγκεφάλου επιβεβαιώνουν παλιότερες παρατηρήσεις, για την συμμετοχή γενετικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένεια τους (Kalaria 2001).

Τρία είδη αγγειακών δυσπλασιών που σχετίζονται μέχρι τώρα με παθογόνες μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια (Πίνακας 3). Μερικές οικογενής μορφές αιμαγγειώματος βρέθηκε να έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRIT1*, ενώ συνδέσεις έχουν γίνει με τους χρωμοσωμιακούς τόπους 7p και 3q.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο της *ενδογλίνης* βρέθηκαν σε οικογένειες με αιμορραγικές τηλαγγειακτασίες, ενώ συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο *PKD1*, που προκαλεί

οικογενής μορφές πολυκυστικών νεφρών, αναγνωρίστηκαν σε τρεις οικογένειες που εμφάνιζαν όψιμη εμφάνιση πολυκυστικών νεφρών και ενδοεγκεφαλικά ανευρύσματα. Οι βασικοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί, μέσω των οποίων οι μεταλλάξεις σε ένα γονίδιο προάγουν την εμφάνιση αγγειακών δυσπλασιών, δεν είναι μέχρι σήμερα επαρκώς κατανοητοί.

Μορφή	Γονίδιο	Θέση	Κληρονομικότητα
Εγκεφαλικές σπαραγγώδεις δυσπλασίες	KRIT1	7q11.2	Αυτοσωμ. επικρατή
		7q15-13	Αυτοσωμ. επικρατή
		3q25.2	Αυτοσωμ. επικρατή
Αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες -κληρονομική αιμορραγική τηλεγγειεκτασία	endoglin	9q	Αυτοσωμ. επικρατή
		activin receptor- like kinase	12q
Οικογενείς φλεβώδεις δυσπλασίες	Tie-2	9p	Αυτοσωμ. επικρατή

Πίνακας 3.
Είδη αγγειακών δυσπλασιών.

■ Μελέτες συσχέτισης ΑΕΕ με γενετικούς πολυμορφισμούς

Οι γενετικές μελέτες συσχέτισης γονιδιακών πολυμορφισμών με τα ΑΕΕ, αφορούν στην πλειοψηφία τους, μελέτες συσχέτισης με ισχαιμικά ΑΕΕ (Πίνακας 4).

Πρόκειται κυρίως για πολυμορφισμούς σε γονίδια που εμπλέκονται στις μεταβολικές οδούς των λιπιδίων, του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου, της ομοκυστεΐνης, των αιμοστατικών παραγόντων και του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Πίνακας 4). Η πλειοψηφία των μελετών έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα, γεγονός που ενδεχομένως αντανακλά τις μεθοδολογικές διαφορές των μελετών ή το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των πληθυσμών που μελετήθηκαν.

Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Μέθοδος	Ασθενείς	Έτος	Αποτέλεσμα
<i>Αιμόσταση</i>					
Παράγοντας V	Q506 Leiden	case-control	236	1995	Αρνητικό
Παράγοντας V	Q506 Leiden	case-control	53	1996	Θετικό
Προθρομβίνη	G20210A	case-control	259	1999	Αρνητικό
Προθρομβίνη	G20210A	case-control	72	1998	Θετικό
Παράγοντας VII	R353Q	case-control	286	1997	Αρνητικό
Παράγοντας VII	R353Q	δεν υπάρχει εργασία με θετικά αποτελέσματα			
Ινωδογόνο	G455A	case-control	227	1997	Θετικό
Ινωδιγόνο	G455A	δεν υπάρχει εργασία με αρνητικά αποτελέσματα			
Παράγοντας XIII	Val34Leu	case-control	529	1998	Αρνητικό
Παράγοντας XIII	Val34Leu	δεν υπάρχει εργασία με θετικά αποτελέσματα			
GpIIb/IIIa	PIA2	case-control	505	1998	Θετικό
GpIIb/IIIa	PIA2	case-control	209	1997	Αρνητικό
<i>Σύστημα ρενίνης/θαγγειοτενσίνης</i>					
ACE	I/D	case-control	510	1998	Θετικό
ACE	I/D	case-control	488	1995	Αρνητικό
<i>Παραγωγή νιτρικού οξέως</i>					
eNOS	Glu298Asp	case-control	361	1998	Αρνητικό
eNOS	Glu298Asp	δεν υπάρχει εργασία με θετικά αποτελέσματα			
<i>Μεταβολισμός ομοκυστεΐνης</i>					
MTHFR	C677T	case-control	345	1997	Αρνητικό
MTHFR	C677T	δεν υπάρχει εργασία με θετική συσχέτιση			
<i>Μεταβολισμός λιπιδίων</i>					
ApoE	ε2/ε3/ε4	cross-sectional	260	1996	Θετικό
ApoE	ε2/ε3/ε4	cross-sectional	234	1998	Αρνητικό
Παραοξονάση I	Q192R	cross-sectional	197	1998	Αρνητικό
Παραοξονάση I	Q192R	cross-sectional	218	2002	Θετικό
Παραοξονάση I	L55M	cross-sectional	316	2000	Θετικό
Παραοξονάση I	L55M	δεν υπάρχει εργασία με αρνητικά αποτελέσματα			

Πίνακας 4.
Γενετικοί πολυμορφισμοί σε μελέτες συσχέτισης με ΑΕΕ
(τροποποιημένος από Hassan 2000).

Δύο πολυμορφισμοί στο γονίδιο της ACT έχουν συσχετισθεί με ΑΕΕ. Ο πολυμορφισμός A1252G (ACT Isehara-1) που οδηγεί στην αλλαγή Met/Val στη θέση 389 έχει συσχετισθεί, τόσο με ισχαιμικά ΑΕΕ, όσο και με μικροαγγειοπάθεια του ΚΝΣ (Tsuda 1992, Tachikawa 2001). Ο δεύτερος πολυμορφισμός της ACT που έχει συσχετισθεί με ΑΕΕ είναι ο πολυμορφισμός Ala/Thr στην θέση -15 του γονιδίου της α₁-αντιχυμοτροψίνης και μέχρι σήμερα έχει συσχετισθεί μόνο με αιμορραγικά ΑΕΕ (Vila 2000, Obach 2001).

Ο γονότυπος ACT -T/T βρέθηκε να σχετίζεται με αιμορραγικά ΑΕΕ, σε Ισπανούς ασθενείς, οι οποίοι είχαν φυσιολογική αρτηριακή πίεση. Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η συμμετοχή του πολυμορφισμού σε άλλους πληθυσμούς και ειδικότερα σε έλληνες ασθενείς με ΑΕΕ.

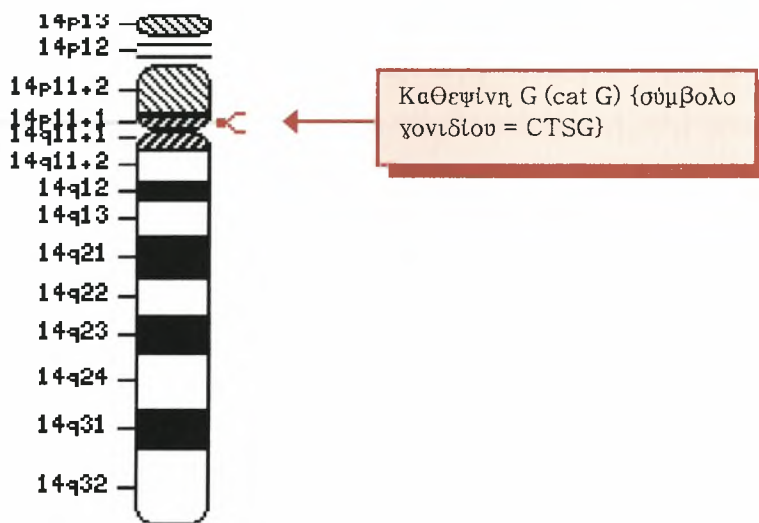
Η α₁-αντιχυμοτροψίνη ανήκει σε μία ομάδα αναστολέων των πρωτεασών σερίνης που κωδικοποιούνται στο χρωμόσωμα 14. Ειδικότερα η α₁-αντιχυμοτροψίνη αποτελεί ισχυρό αναστολέα της καθεψίνης G, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου που εκκρίνεται από τα ουδετερόφιλα κύτταρα και η αυξημένη δραστηριότητα του έχει ενοχοποιηθεί, μεταξύ άλλων και για αυξημένη συσσώρευση αιμοπεταλίων και διαταραχές των πηκτικών μηχανισμών.

Ο πολυμορφισμός ACT -TT έχει συσχετισθεί επίσης, με τρία άλλα νευρολογικά νοσήματα, την νόσο Alzheimer (AD), την νόσο Parkinson (PD) και την εγκεφαλική αμυλοειδική εγκεφαλοπάθεια (Kamboh 1995, Munoz 1999, Yamada 1998).

ΚΑΘΕΨΙΝΗ G (cat G)

Η ανθρώπινη καθεψίνη G ανήκει στην οικογένεια των πρωτεασών σερίνης, που είναι ενδοπεπτιδάσες με ενεργό υπόλειμμα σερίνης και έχει μοριακό βάρος περίπου 28 kDa (Selak 1994, Sambrano 2000).

Το γονίδιο της έχει εντοπιστεί στο χρωμόσωμα 14q11.2 (Εικόνα 8) εκτείνεται σε μήκος 2,7 ζευγών kb του γενομικού DNA και αποτελείται από 5 εξόνια και 4 ιντρόνια (Hohn 1989). Η cat G βρίσκεται μέσα στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα (Polanowska 1998).



Εικόνα 8.

Τοπογραφική θέση της καθεψίνης G στο χρωμόσωμα 14.

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί τέσσερις πολυμορφισμοί, οι *G-618C*, *G-315A*, *C-179T*, *C-160T*, στο υποκινητή (5'-περιοχή πλαισίωσης) και ένας, ο *Asn125Ser* στην περιοχή κωδικοποίησης του γονιδίου. Το αλληλόμορφο *Ser125* συνδέεται με αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου του πλάσματος σε στατιστικά σημαντικό βαθμό καθώς και με ισχαιμικά ΑΕΕ (Hermann 2001).

Λειτουργία

Η cat G ενεργοποιεί κύτταρα, όπως είναι τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που εκφράζουν υποδοχείς της θρομβίνης (Selak 1994, Rehault 1999), προκαλώντας παρόμοια αποτελέσματα με την θρομβίνη, δηλαδή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και έτσι μπορεί να οδηγήσει σε θρόμβωση (Renesto 1997). Η ενεργοποίηση αυτή των αιμοπεταλίων από την cat G απαιτεί την πρωτεόλυση του υποδοχέα (Selak 1990).

Θεωρείται επίσης ότι προκαλεί την συσσώρευση αιμοπεταλίων και μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C, μίας πρωτεΐνης του μονοπατιού των κινασών, με τρόπο παρόμοιο με αυτό που προκαλεί και η θρομβίνη (Selak 1994).

Η καθεψίνη και η θρομβίνη είναι οι *μόνοι* αγωνιστές αιμοπεταλίων (Selak 1994), που είναι πρωτεάσες και οι περισσότερες δράσεις τους απαιτούν την καταλυτική δραστηριότητα ενζύμων. Εμφανίζουν ομοιότητα στη δυνατότητα να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια, αλλά δρουν μέσω διαφορετικών υποδοχέων.

Η cat G καταστέλλει την παραγωγή της προστακυκλίνης, προκαλώντας την απελευθέρωση του αναστολέα της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (PAI-1), και διασπά την γλυκοπρωτεΐνη (GPIb) του υποδοχέα GP Ib / IX (Herrmann 2001), προωθώντας έτσι την ενδοαγγειακή θρόμβωση.

Η cat G διασπά (Greco 2002, Bruce 1984) το κολλαγόνο τύπου II, τις πρωτεογλυκάνες, την ελαστίνη, το ινωδογόνο, τους παράγοντες πήξης, τις ανοσοσφαιρίνες, τα συστατικά του συμπληρώματος, το αγγειοτενσινογόνο και (Ermoloeff 1998). Αυτή η λειτουργία της διάσπασης των πρωτεϊνών φυσιολογικά ελέγχεται από αναστολεις πρωτεϊνών, που βρίσκονται στο πλάσμα και στις εκκρίσεις των πνευμόνων.

Μία επιπλέον δραστηριότητα της cat G είναι η αντιμικροβιακή, η οποία είναι ανεξάρτητη της δραστηριότητας των πρωτεάσεων. Η cat G περιέχει δύο αντιμικροβιακές ακολουθίες, που και οι δύο ή η καθεμία μόνη της, μπορούν να συμβάλουν στη βακτηριοκτόνο δραστηριότητά της.

Στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων υπάρχουν μόρια, που δεσμεύουν την cat G, μέσω της ενεργής τους περιοχής, καθώς η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων απαιτεί τη δέσμευση της πρωτεολυτικά ενεργής μορφής της cat G (Selak 1990). Η δέσμευση της εμφανίζει συνεργατικότητα, η οποία αναστέλλεται από το PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) μετατοπίζοντας μερικώς συνδεδεμένη cat G.

Δομή

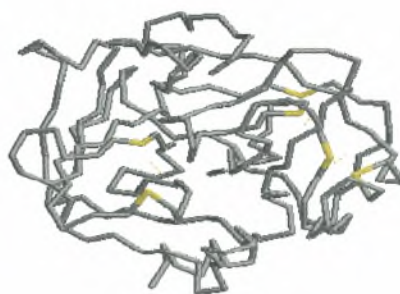
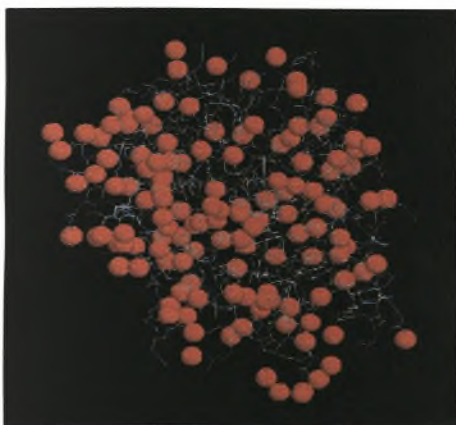
Αποτελείται από δύο βήτα πτυχωτές επιφάνειες, τέσσερις άλφα έλικες και από περιοχές βρόχων (Εικόνα 9).

Εικόνα 9.
Δομή καθεψίνης G.



Με την πρωτεΐνη συνδέονται 138 μόρια ύδατος (Εικόνα 10).

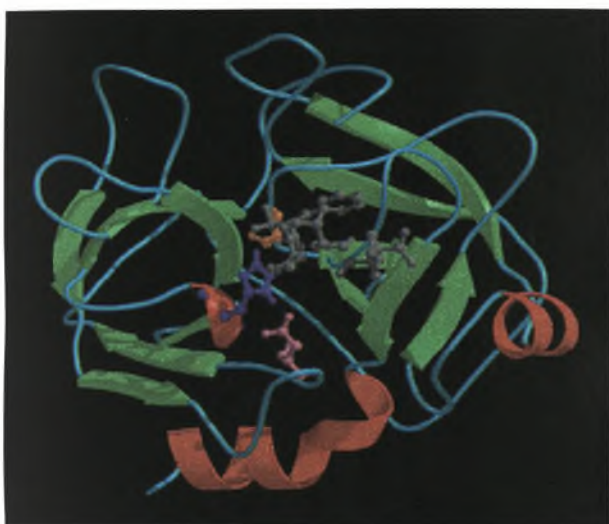
Υπάρχουν τρεις δισουλφιδικές γέφυρες, που συνδέουν τα σκέλη αυτής της πρωτεΐνης μαζί, μεταξύ των cys (49) και cys (65), cys (142) και cys (207) και τελικά μεταξύ των cys (172) και cys (186). Τα υπολείμματα κυστεΐνης που περιλαμβάνονται στις δισουλφιδικές γέφυρες είναι υποδειγμένα με κίτρινο στην εικόνα 10.



Εικόνα 10.

Σύνδεση της cat G με μόρια ύδατος (αριστερά).
Οι δισουλφιδικές γέφυρες στη δομή της cat G (δεξιά).

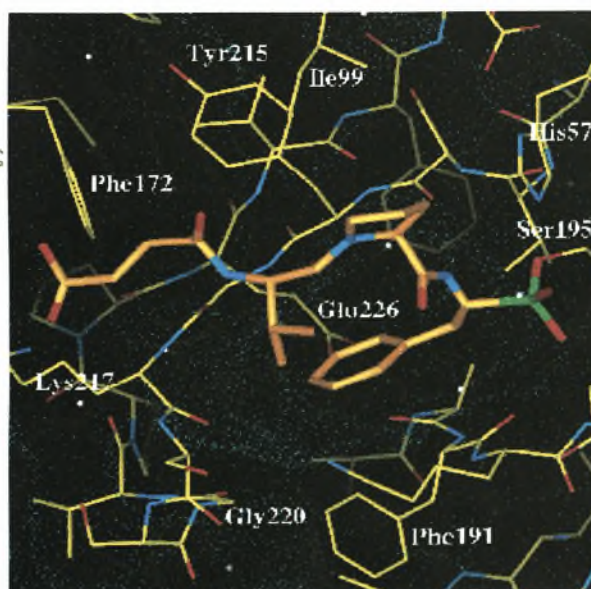
Σήμερα είναι γνωστή η αλληλουχία των αμινοξέων και η δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας των πρωτεασών σερίνης. Όλες έχουν μια ίδια πτυχή, που αποτελείται από δύο βήτα πτυχωτές επιφάνειες, με μια καταλυτική τριάδα Asp-102, His-57, και Ser-195, στη διεπιφάνεια των δύο περιοχών (Εικόνα 11).



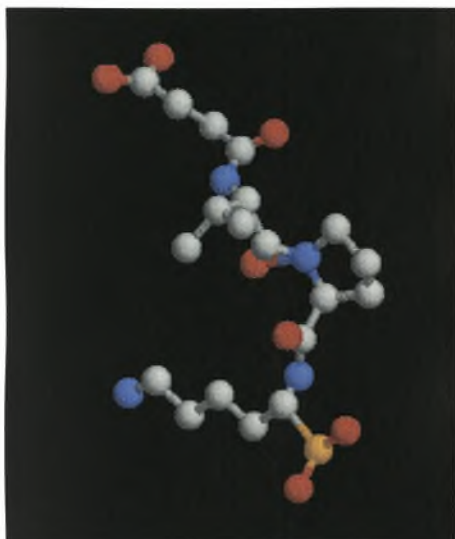
Εικόνα 11.
Καταλυτική τριάδα.
Η His-57 φαίνεται με
κόκκινο, η Asp-102 με
ροζ και η Ser-195 με
πορτοκάλι.

Η cat G εμφανίζει μία ιδιαιτερότητα ως προς την δομή και αυτή είναι η παρουσία της Glu226, (Polanowska 1998, Greco 2002), στο κατώτατο σημείο της ενεργού περιοχής (Εικόνα 12), διαιρώντας το σε δύο τμήματα. Για αυτόν τον λόγο, η βενζυλική πλευρά της αλυσίδας του ανασταλτικού παράγοντα δεν καταλαμβάνει πλήρως την κοιλότητα, αλλά βρίσκεται στην είσοδο.

Εικόνα 12.
Αλληλεπίδραση καταλυτικής τριάδας
με την ενεργό περιοχή.



Ο συνδέτης για την cat G είναι Suc-val-Pro-Lysp- (Oph)². Χωρίζεται σε δύο μέρη, το SIN (succinic acid) και το KPH (lysine phosphinic acid) τα οποία καταλαμβάνουν την ενεργό περιοχή της πρωτεΐνης (Hof 1996). Αυτά τα δύο μόρια περιπλέκονται με μια Val και μια Pro, για να διαμορφώσουν ολόκληρο τον συνδέτη (Εικόνα 13).



Εικόνα 13.
Συνδέτης για την cat G.

Η καθεψίνη G μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με τον ανασταλτικό παράγοντα του πεπτιδικού φωσφονυλίου (Εικόνα 14).



Εικόνα 14.
Σύμπλοκο ACT με τον
παράγοντα του πεπτιδικού φωσφονυλίου

Η καθεψίνη G μπορεί επίσης να σχηματίσει σύμπλοκο και με τον suc-val-pro-phep-(orh)² ανασταλτικό παράγοντα (Εικόνα 11, με γκρι χρώμα). Σε αυτόν τον συνδέτη, αντί ενός φωσφορικού οξέος της λυσίνης, υπάρχει συνδεδεμένο φωσφορικό οξύ της φαινυλαλανίνης.

Ακόμη, η cat G δεσμεύεται στενά από την ηπαρίνη σχηματίζοντας σύμπλοκο, το οποίο προστατεύει την cat G από την αναστολή της α₁-αντιχυμοτριψίνης, του ανασταλτικού παράγοντα της α₁-πρωτεΐνάσης και της εγκλίνη c (Greco 2002), αφού αυτοί οι τρεις παράγοντες δεν μπορούν να δεσμεύουν ηπαρίνη. Η προστασία αυτή, της cat G οφείλεται στην παρεμπόδιση της προσέγγισης των ανασταλτικών αυτών παραγόντων στο ενεργό της κέντρο.

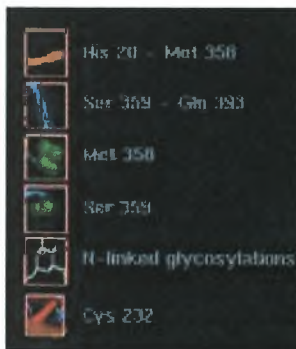
A₁-ΑΝΤΙΧΥΜΟΤΡΥΨΙΝΗ (ACT)

Η α₁-αντιχυμοτριψίνη είναι μέλος της οικογένειας γονιδίων, που τα προϊόντα τους είναι αναστολείς σερινοπρωτεασών (σερπίνες) και δρουν σαν χυμοτριψίνη, με κυριότερο στόχο την cat G των ουδετεροφίλων (Travis 1983, Kalsheker 1996).

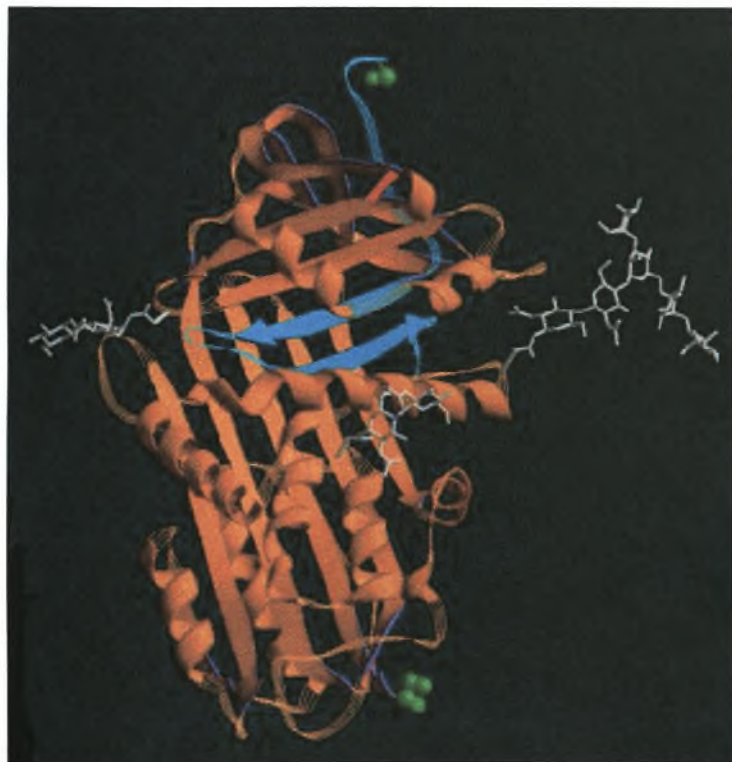
Είναι γλυκοπρωτεΐνη, που βρίσκεται στο πλάσμα, σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση -25mg/100ml (Travis 1983).

Η ACT σχηματίζει ισομοριακά σύμπλοκα με τις πρωτεΐνάσες στόχους της και έτσι, για παράδειγμα μέσω της αναστολής της πρωτεάσης του μετατρεπτικού ενζύμου, εμποδίζει την μετατροπή του αγγειοτενσινογόνου I στην δραστική μορφή του, στο αγγειοτενσινογόνο II, που έχει αγγειοσυσπαστικές ιδιότητες.

Η τελική λειτουργική πρωτεΐνη περιέχει 394 αμινοξέα (Byth 1994, Rubin 1990), έχει μοριακό βάρος ~58 kDa (Εικόνα 15), του οποίου το 25% υπολογίζεται ότι είναι υδατάνθρακες. Η πρωτεΐνη εμφανίζει ομοιότητα 45% με την α₁-αντιτριψίνη.



Εικόνα 15.
Δομή της ACT.



Τα επίπεδα της ACT στον ορό είναι αυξημένα σε διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 (Matsubara 1990). Οι ασθενείς με AD, με PD, με αγγειακή άνοια και με ΑΕΕ είχαν αυξημένα επίπεδα ACT, ενώ οι ασθενείς με ΑΕΕ του νωτιαίου μυελού και με μυϊκή δυστροφία Duchenne εμφάνιζαν μειωμένα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες.

	Άνδρες	Γυναίκες	Σύνολο	Μέση τιμή	Όρια
Νόσος Alzheimer	17	21	38	71.1	56-98
Μάρτυρες	38	51	89	57.2	21-92
Αγγειακή άνοια	10	10	20	73.9	53-83
Νόσος Parkinson	6	12	18	66.3	44-83
ΑΕΕ του ΝΜ	7	7	14	50.4	28-69
ΑΕΕ	9	6	15	68.1	65-83
Μυϊκή δυστροφία Duchenne	14	0	14	11.5	6-21

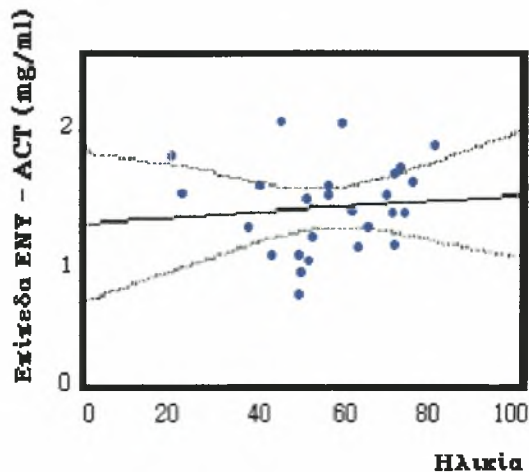
Πίνακας 5.
Επίπεδα ACT στον ορό σε μάρτυρες και ασθενείς με εκφυλιστικά νοσήματα.

Τα επίπεδα της ACT είναι αυξημένα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, όπως φαίνεται στον πιο κάτω πίνακα.

	Άνδρες	Γυναίκες	Σύνολο	Μέση τιμή	Όρια
Νόσος Alzheimer	5	10	15	73.4	56-91
Μάρτυρες	13	13	26	53.4	20-80
Αγγειακή άνοια	2	4	6	72.0	63-78
ΑΕΕ	4	3	7	68.6	59-83

Πίνακας 6.
Επίπεδα της ACT στο ΕΝΥ μαρτύρων και ασθενών με νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

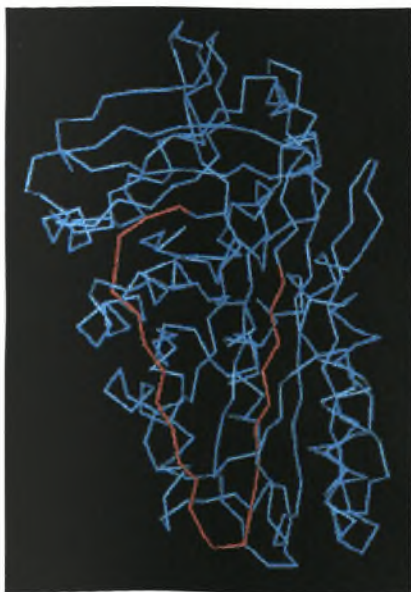
Στα φυσιολογικά δείγματα δεν υπήρξε κανένας σημαντικός συσχετισμός με τα επίπεδα ορών και ENY της ACT. Τα επίπεδα ήταν σχεδόν σταθερά για όλες τις ηλικίες (Εικόνα 16).



Εικόνα 16.
Επίπεδα ACT στο ENY φυσιολογικών μαρτύρων.

Τόσο η ACT, όσο και η α_1 -αντιτροψίνη ανήκουν στην μεγάλη κατηγορία των αναστολέων των πρωτεασών που φέρονται με το όνομα *σερπίνες*.

Η τρισδιάστατη δομή της εμφανίζει μεγάλες β - πτυχωτές επιφάνειες (A-C), μια ενεργό καλυμμένη αγκύλη στο κέντρο και 8 καθορισμένες με σαφήνεια έλικες (A-H), που περιλαμβάνουν το 80% των υπολειμμάτων αμινοξέων (Εικόνα 17).

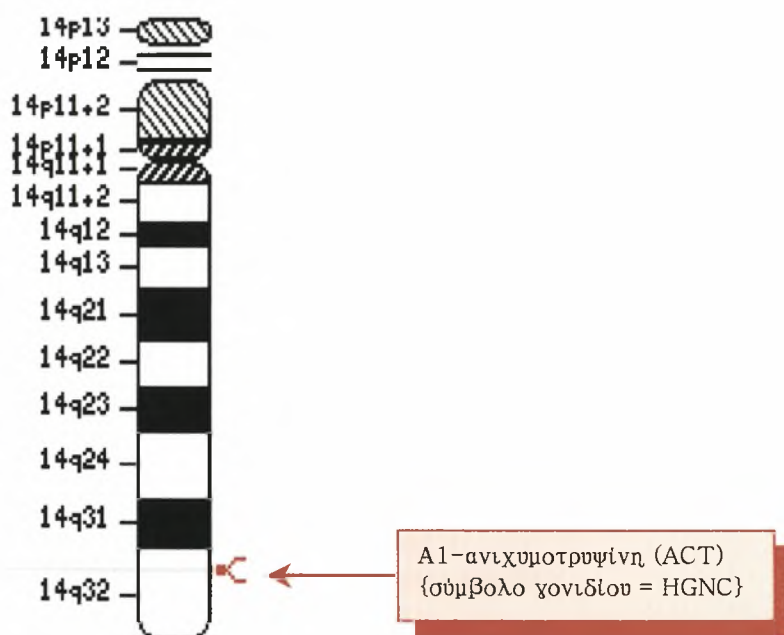


Εικόνα 17.
Τοπική διαγραμματική παρουσίαση της ενεργού καλυμμένης αγκύλης στο κέντρο των σερπινών.

Το γονίδιο της έχει μήκος 12 ζεύγη kb, με 5 εξόνια και 4 ιντρόνια και έχει μεγάλη ομοιότητα με το γονίδιο της α₁-αντιτρυψίνης (Bao 1981).

Είναι τμήμα ενός πληθυσμού γονιδίων, σχετιζόμενων με δομικούς αναστολείς σερινοπρωτεασών, οι οποίοι εντοπίζονται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 14 (Εικόνα 18). Ο πληθυσμός των γονιδίων αυτών περιλαμβάνει την ACT, τον αναστολέα της πρωτεΐνης C (PCI), την γλοβίνη που δεσμεύει κορτικοστεροειδή (CBG) και α₁-ψευδογονίδιο που εμφανίζει παρόμοια δράση με την ACT (PIL).

Η σειρά των γονιδίων είναι: κεντρομερές - CBG - PIL - PI- PCI- ACT – τελομερές (Byth 1994).



Εικόνα 18.
Τοπογραφική Θέση της ACT στο χρωμόσωμα 14.

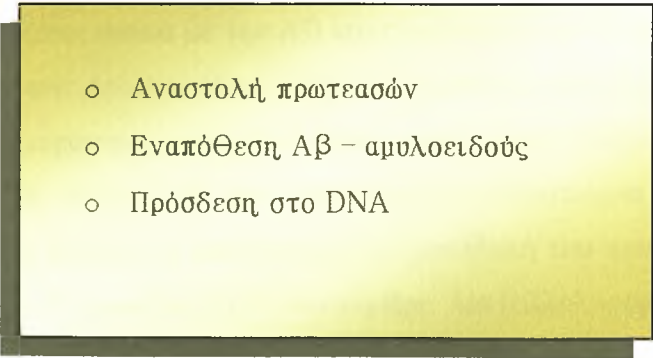
Βιολογική Λειτουργία της ACT

Η ACT είναι πρωτεΐνη οξείας φάσης (Travis 1983), και η συγκέντρωσή της διπλασιάζεται μέσα σε 8 ώρες από την έναρξη της φλεγμονής. Εκτός όμως από δείκτη για τις μολύνσεις θεωρείται και δείκτης για όγκους.

Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ (Matsubara 1990), αλλά το mRNA της έχει ανιχνευθεί και στην καρδιά, στον πνεύμονα, στο νεφρό και σε μικρότερο βαθμό τον εγκέφαλο και στον προστάτη (Gendler 1984).

Μέχρι σήμερα είναι γνωστές τρεις βιολογικές λειτουργίες για την ACT (Πίνακας 7), με σημαντικότερη την αναστολή των πρωτεϊνικών στόχων (Kalsherer 1996).

Η ACT έχει μια μοναδική ιδιότητα, μεταξύ των πρωτεϊνικών σερίνης και αυτή έγκειται στην ικανότητά της να δεσμεύει DNA. Παρόλο που μέχρι σήμερα η σημασία αυτής της ιδιότητας δεν είναι γνωστή, πιθανολογείται η συμμετοχή της στην εμφάνιση μεταλλάξεων.

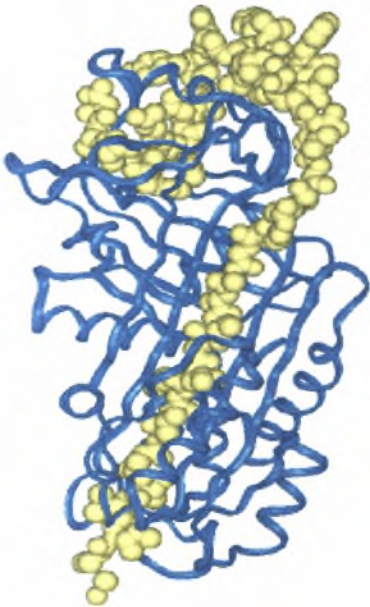
- 
- Αναστολή πρωτεασών
 - Εναπόθεση Αβ - αμυλοειδούς
 - Πρόσδεση στο DNA

Πίνακας 7.
Κύριες λειτουργίες της ACT.

Πρόσφατα βιοχημικά δεδομένα (Wang 2002, Nacmias 1998) δείχνουν, ότι η ACT έχει την δυνατότητα να επιταχύνει την καθίζηση του αμυλοειδούς ινών, *in vitro*. Η συμμετοχή αυτή της ACT, στους μηχανισμούς σχηματισμού του Αβ αμυλοειδούς (Εικόνα 18) και η ανίχνευσή της στις γεροντικές πλάκες ασθενών με AD, την έχει εμπλέξει στην παθογένεια των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (Kamboh 1995, Munoz 1999, Yamada 1998).

Είναι γνωστό ότι το αλληλόιο ϵ_4 της ApoE σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης AD (Kamboh 1995). Όπως η πρωτεΐνη ApoE, έτσι και η ACT δεσμεύεται (Yamada

1998) στο β-αμυλοειδές πεπτίδιο (AβP) με υψηλή συγγένεια (Εικόνα 19), στις νηματοειδείς εναποθέσεις, που ανιχνεύονται σε εγκεφάλους ασθενών με AD.

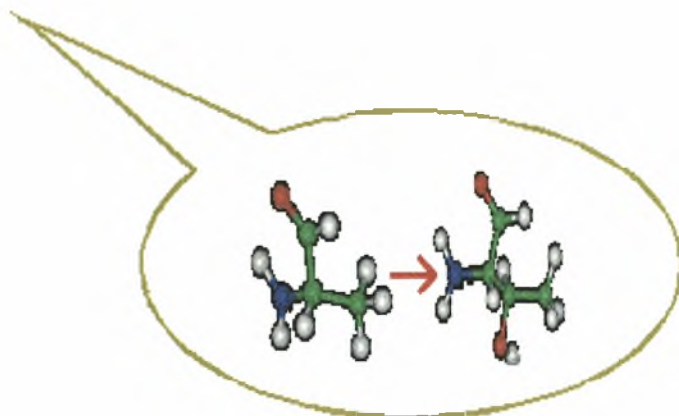


Εικόνα 19.
Σύμπλεγμα μεταξύ του αμυλοειδούς πεπτιδίου της AD και της ACT.

Ο πολυμορφισμός στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος του γονιδίου της ACT έχει βρεθεί να σχετίζεται θετικά με την AD και ειδικότερα ο συνδυασμός του γονότυπου ACT -T/T με τον ApoE - ε4/ε4, αυξάνει δραματικά τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Ο πολυμορφισμός αυτός είναι λειτουργικός, γιατί η υδροφοβική Ala αντί της υδροφιλικής Thr (Εικόνα 20) έχει επιπτώσεις στη δυνατότητα διακίνησης της στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα την μεταβολή του ποσοστού έκκρισης της (Kamboh 1995). Η πρωτεΐνη ACT που περιέχει Ala (αλληλόμορφο γονίδιο ACT*A) μπορεί να εκκριθεί δε υψηλότερο ποσοστό στο πλάσμα από αυτή με Thr (ACT*T).

Αυτό συμφωνεί και με την παρατήρηση ότι οι ασθενείς AD έχουν υψηλά ποσά ACT στο πλάσμα και στο ENY.

Εικόνα 20.
Σχηματική αναπαράσταση του πολυμορφισμού στο πεπτίδιο σήματος στη θέση -15.



Επειδή η PD εμφανίζει μερικά κοινά χαρακτηριστικά με την AD και κυρίως σε επίπεδο ιστολογίας του εγκεφάλου, το 1997 διερευνήθηκε για πρώτη φορά η πιθανή συμμετοχή του πολύμορφισμού στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος του ACT με την PD (Yamamoto).

Βρέθηκε ότι ο γονότυπος ACT -15A/A αυξάνει το σχετικό κίνδυνο (3.36) για εμφάνιση της νόσου σε Ιάπωνες ασθενείς. Αυτή η αύξηση ήταν ανεξάρτητη από τον γονότυπο της ApoE. Τα αποτελέσματα αυτά όμως, δεν επιβεβαιώθηκαν στη Κίνα και στην Ευρώπη (Wang 2002, Tang 2002, Munoz 1999).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι να μελετηθεί για *πρώτη φορά σε Έλληνες ασθενείς* με αιμορραγικό ΑΕΕ, η γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού -15A/T του γονιδίου της αι-αντιχυμοτροψίνης και των αιμορραγικών ΑΕΕ (στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος).

Ασθενείς

Μελετήθηκαν 43 ασθενείς με ΑΕΕ, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, το χρονικό διάστημα από 1/1/2001 έως και 31/3/2002.

Όλοι οι ασθενείς εμφάνιζαν οξύ ΑΕΕ αιμορραγικού τύπου (ενδοεγκεφαλική αιμορραγία) και η διάγνωση είχε επιβεβαιωθεί με αξονική τομογραφία εγκεφάλου.

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 8.

Από την μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς με υπαραχνοειδή αιμορραγία, κρανιοεγκεφαλική κάκωση, αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες, διαταραχές της πήκτικότητας του αίματος και ασθενείς που λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 50 φυσιολογικά άτομα, με ίδια περίπου κατανομή φύλου και ηλικίας (Πίνακας 8).

	N	Ηλικία (έτη ± SD)	Φύλο (Α/Γ)	Υπέρταση (%)	ΣΔ (%)
Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία	43	62.5 ± 8.1	29/13	31 (72.1)	12 (27.9)
Μάρτυρες	50	61.7 ± 8.3	32/18	11 (22.0)	7 (14.0)

Πίνακας 8. Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών και μαρτύρων.

Οι άνδρες υπερερούσαν των γυναικών με αιμορραγικό ΑΕΕ. Η αναλογία ήταν περίπου 2:1.

Γνωστοί παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ όπως η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης βρέθηκαν, όπως ήταν αναμενόμενο, με αυξημένη συχνότητα (72.1% και 27.9% αντίστοιχα) σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Το πειραματικό μέρος της μελέτης περιλαμβάνει πρωτόκολλα μελέτης του πολυμορφισμού Ala/Thr στη θέση -15 του γονιδίου της :

- *Απομόνωση γενομικού DNA από τα εμπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος.*
Η απομόνωση έγινε με την κλασσική τεχνική της εξαλάτωσης (Sambrook 1989).

- *Πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων περιοχών του DNA με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) .*

Τα τμήματα του DNA που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου της ACT, πολλαπλασιάστηκαν με την μέθοδο της PCR. Η τεχνική αυτή επιτυγχάνει τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος του DNA, που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας, χρησιμοποιώντας κατάλληλα ζεύγη εκκινητών.

- *Πέψη των τμημάτων που προέκυψαν από την PCR με ειδικά περιοριστικά ένζυμα.*
Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν στην επίδραση συγκεκριμένων ενδονουκλεασών περιορισμού. Πρόκειται για ένζυμα βακτηριακής προέλευσης που αναγνωρίζουν και τέμνουν ειδικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA , με κατεύθυνση 5'→3'.

Χρησιμοποιήθηκαν ενδονουκλεάσες τύπου II, οι οποίες αναγνωρίζουν μια ειδική αλληλουχία και τέμνουν το DNA μέσα σε αυτή. Τα ένζυμα τύπου II είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στη χαρτογράφηση και μελέτη του DNA, λόγω ειδικότητας αναγνώρισης.

Η δράση τους εξαρτάται από την θερμοκρασία, τη σύσταση του διαλύματος επώασης και τη μοριακή σχέση του ενζύμου με το υπόστρωμα.

Η αντίδραση έγινε σε ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν ιόντα Mg^{++} , που λειτουργούν ως συμπαράγοντες και ιόντα Na^{+} .

Για την προφύλαξη του DNA από προσμείξεις χημικών ουσιών, προστέθηκε αλβουμίνη βοός (bovine serum albumin) η οποία προφυλάσσει τα ένζυμα, τα οποία διατηρήθηκαν σε διάλυμα 50% γλυκερόλης , στους $-20^{\circ}C$.

- *Αναγνώριση των προϊόντων της πέψης και αξιολόγηση των ευρημάτων.*

Η καθαρότητα και η επάρκεια των προϊόντων της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των

τμημάτων του DNA με βάση το μέγεθος τους. Η ανάδειξη των τμημάτων έγινε με χρώση τους, με βρωμιούχο αιθίδιο (φθορίζουσα ουσία που διεισδύει ανάμεσα στις βάσεις του DNA).

Ανάλογα, για τα προϊόντα της πέψης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης *metaphor*.

Η αναγνώριση των τμημάτων έγινε με έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία και ακολούθησε φωτογράφιση .

ΤΕΧΝΙΚΕΣ

I. Απομόνωση γενομικού DNA

Για την απομόνωση του γενομικού DNA από το ολικό αίμα (Πίνακας 9), απομακρύνθηκαν αρχικά τα ερυθρά αιμοσφαίρια, μετά από αιμόλυση τους σε υπότονο διασπεσταγμένο νερό (ddH₂O). Τα εμπύρηννα κύτταρα απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές / λεπτό, στους 4 °C για 15 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη των διαλυμάτων Lysis I και II, τα οποία σπάζουν τους πυρήνες των κυττάρων και προκύπτει το DNA.

- Διάλυμα Θραύσης των πυρήνων:

Lysis I [NH₄Cl (155 mM), KHCO₃ (10mM), EDTA (1mM), pH 7.4]

Lysis II [Tris (10 mM), NaCl (400 mM), di-Na EDTA (2mM), pH 8.2]

- Διάλυμα πρωτεΐνάσης K του μύκητα *Tritichium album* (10 mg/ml)

- Διάλυμα 10% w/v SDS (n-Sodium Dodecylsulfate salt)

- Κορεσμένο διάλυμα 6 M NaCl

- Απόλυτη αιθανόλη

- CH₃COONa (3 M)

- Πηκτική αγαρόζης 1%

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γενομικού DNA.

Οι πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες, παρουσία πρωτεΐνάσης K (100 λ), η οποία προκαλεί πεπτική υδρόλυση οδηγώντας σε αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και SDS που ανοίγει την πυρηνική μεμβράνη. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών έγινε με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NaCl και φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές, στους 4 °C για 15 λεπτά.

Το υπερκείμενο που προέκυψε περιέχει το DNA και φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Συλλέχθηκε, ξανά, το υπερκείμενο μέρος του διαλύματος και ακολούθησε καταβύθιση με δύο όγκους απόλυτης αιθανόλης (διπλάσιος όγκος σε σχέση με το

αρχικό διάλυμα) και CH_3COONa σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του αρχικού διαλύματος .

Στη συνέχεια έγινε επώαση στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$, για 24 ώρες και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές, στους $4\text{ }^\circ\text{C}$, για 50 λεπτά.

Αφού ξεπλύθηκε το ίζημα με διάλυμα αιθανόλης 70% πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές, στους $4\text{ }^\circ\text{C}$ για 30 λεπτά, στάδιο το οποίο επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές με διάρκεια φυγοκέντρησης 20 λεπτά.

II. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε 1μg γενομικού DNA, 200 μM από κάθε dNTP, 1λ από κάθε ζεύγος εκκινητών, ρυθμιστικό διάλυμα, 5 διεθνείς μονάδες Taq πολυμεράσης και δισαπεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 50λ. (Πίνακας 10)

- DNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα σε ποσότητα ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]*
- Ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτιδία [40 mM (dNTPs) - αδεδίνης (dATP), γουανίνης (dGTP), κυτοσίνης (dCTP), Θυμίνης (dTTP)]*
- Εκκινητής 1 (Primer F -10 μM)*
- Εκκινητής 2 (Primer R - 10 μM)*
- Ένζυμο : Taq DNA polymerase (5 U/ μl)*
- MgCl_2 (50 mM)
- Δισαπεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Πίνακας 10. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.

* Εταιρία Invotrogen

III. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη (Πίνακας 11) με το περιοριστικό ένζυμο Mva I (Gene Ruller - Fermentas).

- Προϊόν PCR
- Ένζυμο Mva I (1 u/μλ)
- Buffer R⁺
- Δισαπεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Πίνακας 11.

Αντιδραστήρια με τα οποία υποβλήθηκαν σε πέψη τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR.

Το περιοριστικό ένζυμο Mva I, που χρησιμοποιήθηκε, αναγνωρίζει την αλληλουχία :



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενομικού DNA, με την διαδικασία που περιγράφηκε, σε 43 ασθενείς και σε 50 φυσιολογικούς μάρτυρες. Ακολούθησε φωτομέτρηση, σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA στο τελικό διάλυμα με βάσει τον τύπο :

$$\text{Συγκέντρωση DNA} = \text{αραίωση} \times 50 \times \text{OD}_{260}$$

(συγκέντρωση DNA = 50 mg/ml αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα 1)

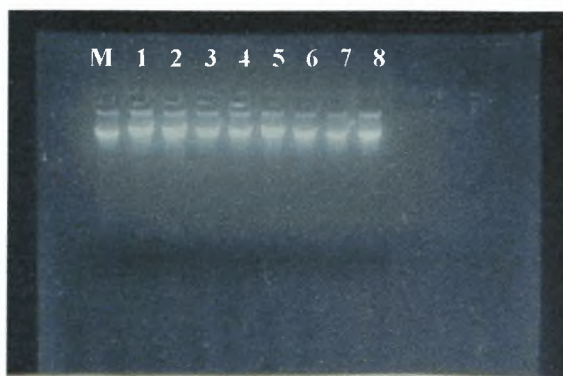
Η καθαρότητα του DNA αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό του λόγου :

$$\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}$$

Ο λόγος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.7 – 1.9.

Μικρότερες τιμές υποδηλώνουν πρόσμειξη πρωτεϊνών, ενώ μεγαλύτερες πρόσμειξη RNA.

Η ακεραιότητα και η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1% , υπό σταθερή τάση 100 V. Ακολούθησε φωτογράφιση της εικόνας της πηκτής (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση γενομικού DNA.
 Διαδρομές 1-8 : Γενομικό DNA των ασθενών.
 M : Μάρτυρας.

II. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών των προεπιλεγμένων τμημάτων του DNA με τη μέθοδο της PCR έγινε, όπως περιγράφηκε στις τεχνικές, σε 35 κύκλους (Πίνακας 12) σε θερμικό κυκλοποιητή (Perkin, Elmer). Κάθε κύκλος περιλάμβανε το στάδιο αποδιάταξης, σύζευξης των εκκινητών με τη μητρική αλυσίδα και επέκτασης των εκκινητών.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι :

Primer F : 5' - CAG AGT TGA GAA TGG AGA - 3'

Primer R : 5' - TTC TCC TGG GTC AGA TTC - 3'

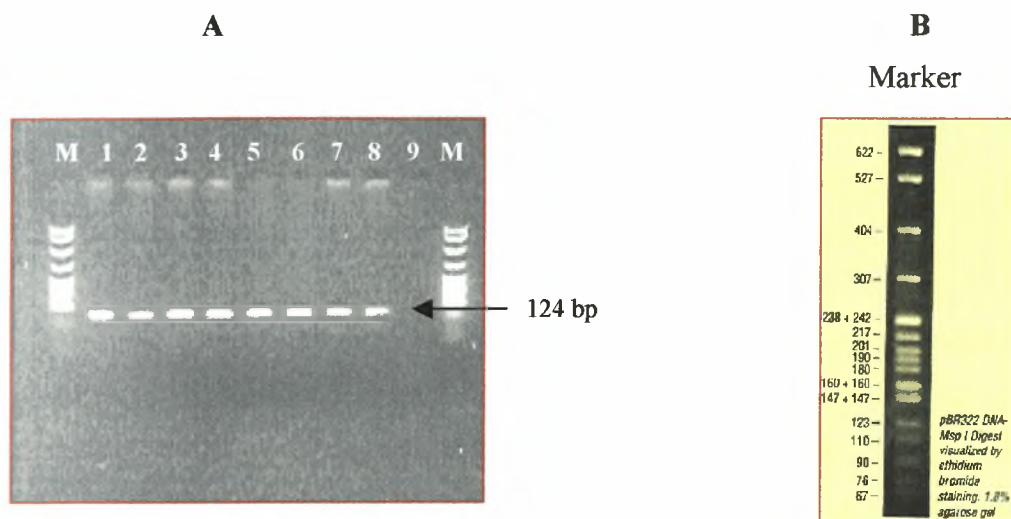
Μετά το τέλος των κύκλων ακολούθησε το στάδιο επέκτασης, για την σταθεροποίηση των προϊόντων της αντίδρασης.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
94	7 min	1
94	30 sec	} 30
55	30 sec	
72	45 sec	
72	7 min	1

Πίνακας 12. Συνθήκες της PCR

Η ανάδειξη των προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αραρόζης 2%. Ηλεκτροφορήθηκαν 10λ προϊόν της PCR και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φX174, που είχε καταταμηθεί με το περιοριστικό ένζυμο Hae III (BioLabs), υπό σταθερή τάση 100 V και ακολούθησε φωτογράφιση.

Το προϊόν της PCR ήταν το αναμενόμενο : 124 bp (Εικόνα 22).



Εικόνα 22.

Α. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.

Διαδρομή 1-8 : προϊόντα της PCR, όπου χρησιμοποιήθηκε DNA το οποίο απομονώθηκε από τα δείγματα ασθενών.

Διαδρομή M : προϊόν PCR, όπου χρησιμοποιήθηκε DNA, το οποίο απομονώθηκε από τα φυσιολογικά δείγματα.

Β. Παρουσίαση μάρτυρα για την εκτίμηση των βαρών.

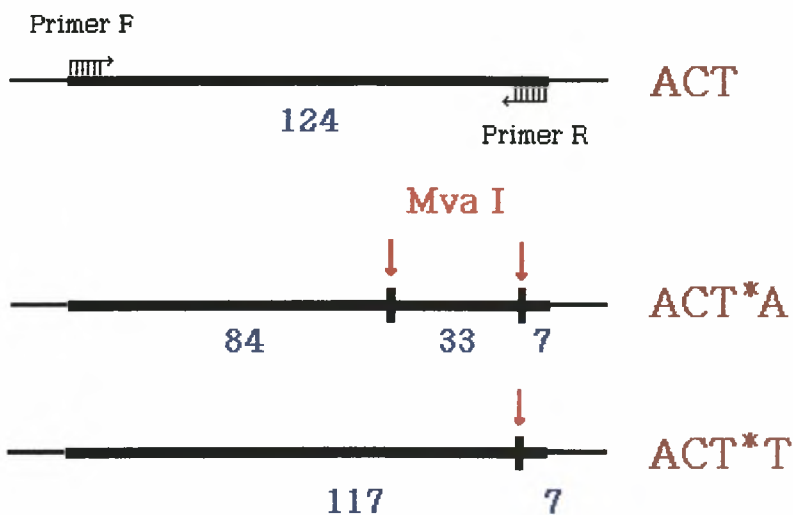
III. Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Τα τμήματα του DNA, που προέκυψαν από την πέψη, διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης Metaphor 3%, υπό σταθερή τάση 100 V. Η συγκεκριμένη αγαρόζη χρησιμοποιήθηκε γιατί παρουσιάζει ικανότητα διαχωρισμού υψηλής ευκρίνειας. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε ο φX174, που είχε καταταμηθεί με την ενδονουκλεάση περιορισμού Hinf I (Gene Ruller – Fermentas).

Ακολούθησε χρώση της πηκτής, με εμβάπτιση σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0.5μg/ml), για 20 λεπτά, έκθεση σε υπεριώδες φως και φωτογράφιση (Εικόνα 24).

Με την χρήση του περιοριστικού ενζύμου MvaI αναγνωρίζονται 2 αλληλία :

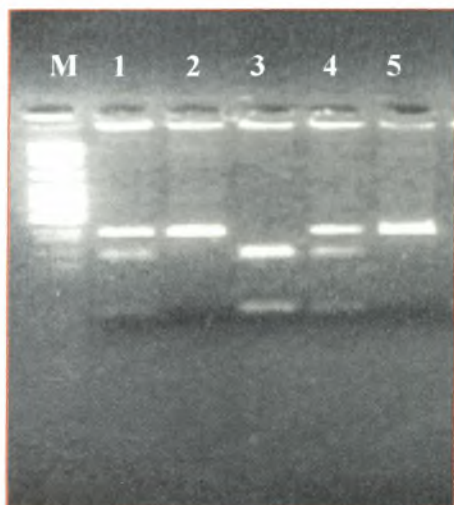
- ACT*A (παρουσία Ala στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος) και
- ACT*T (παρουσία Thr στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος).

Η παρουσία του ACT*A ανιχνεύεται μετά την ηλεκτροφόρηση με την διάσπαση του προϊόντος PCR (Εικόνα 23) σε 3 τμήματα (84, 33 και 7 bp), ενώ η παρουσία του αλληλίου ACT*T γίνεται ορατή με την διάσπαση του προϊόντος PCR σε 2 τμήματα (117 και 7 bp) Και στις δύο περιπτώσεις το τμήμα των 7 bp δεν είναι ορατό και ουσιαστικά η μη διάσπαση του προϊόντος PCR σημαίνει την παρουσία του αλληλίου ACT*T, ενώ η διάσπαση του προϊόντος PCR στα τμήματα 83 και 33 bp υποδηλώνει την παρουσία του αλληλίου ACT*A .



Εικόνα 23. Εμφάνιση των δύο αλληλιών από την πέψη με το MvaI.

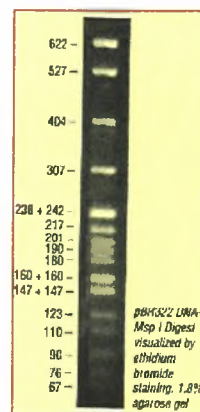
A



← 124/117 bp
 ← 83
 ← 33

B

Marker



Εικόνα 24. Ενδεικτικά τα αποτελέσματα σε 4 ασθενείς μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης (ACT*A/T).

A. Οι ασθενείς 1 και 4 είναι ετεροζυγώτες έχοντας ένα αλληλίο A και ένα αλληλίο T.

Ο ασθενής 2 είναι ομοζυγώτης για το αλληλίο T (ACT* T/T).

Ο ασθενής 3 είναι ομοζυγώτης για το αλληλίο A (ACT*A/A).

Στη διαδρομή 5 φαίνεται το προϊόν του PCR πριν από την πέψη. Με τον ίδιο τρόπο μετρήθηκαν και τα υπόλοιπα δείγματα.

B. Παρουσίαση μάρτυρα για την εκτίμηση των βαρών.

Η κατανομή των γονότυπων της α₁-αντιχυμοτριψίνης φαίνεται στον Πίνακα 13. Η συχνότητα του γονότυπου TT ήταν 23.3 % στους ασθενείς, ενώ στους μάρτυρες ήταν 20.0%.

Δεν προχωρήσαμε σε στατιστική των αποτελεσμάτων λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών και των μαρτύρων.

	n	TT (%)	AT (%)	AA (%)
Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία	43	10 (23.3)	17 (39.5)	16 (37.2)
Μάρτυρες	50	10 (20.0)	24 (48.0)	18 (36.0)

Πίνακας 13.

Κατανομή των γονότυπων της α₁-αντιχυμοτριψίνης στους ασθενείς με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και τους μάρτυρες.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ACT αποτελεί, όπως έχει αναφερθεί, σημαντικό αναστολέα των πρωτεολυτικών ενζύμων και ειδικότερα της cat G. Την τελευταία δεκαετία η ACT έχει εμπλακεί στην παθογένεια δύο μεγάλων κατηγοριών νευρολογικών νοσημάτων, των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων και των ΑΕΕ.

Το γονίδιο της ACT έχει μελετηθεί, σε ασθενείς με ισχαιμικά και αιμορραγικά ΑΕΕ. Ο πολυμορφισμός A1252G (ACT Isehara-1), που οδηγεί στην αλλαγή Met389Val έχει συσχετισθεί, τόσο με ισχαιμικά ΑΕΕ, όσο και με μικροαγγειοπάθεια του ΚΝΣ (Tsuda 1992, Tachikawa 2001).

Ο δεύτερος πολυμορφισμός της ACT, που έχει συσχετισθεί με ΑΕΕ είναι ο πολυμορφισμός Ala /Thr (ACT -A/T) στην θέση -15 του γονιδίου της και μέχρι σήμερα έχει συσχετισθεί μόνο με αιμορραγικά ΑΕΕ (Vila 2000, Obach 2001).

Ο γονότυπος ACT - T/T βρέθηκε να σχετίζεται σε Ισπανούς ασθενείς με αιμορραγικά ΑΕΕ, οι οποίοι είχαν φυσιολογική αρτηριακή πίεση. Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί η συμμετοχή του πολυμορφισμού σε άλλους πληθυσμούς και ειδικότερα σε έλληνες ασθενείς με ΑΕΕ.

Υπάρχουν 6 εργασίες που αναφέρουν θετική συσχέτιση του αλληλίου ACT* -15A με την νόσο Alzheimer, ενώ άλλες 9 εργασίες συμπέραναν ότι δεν υπάρχει θετική ή αρνητική συσχέτιση (Wang 2002). Πιθανή εξήγηση για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα, είναι το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των μελετηθέντων πληθυσμών. Επιπλέον, επειδή υπάρχουν τουλάχιστον άλλοι 5 πολυμορφισμοί στο γονίδιο ACT, υπάρχει η πιθανότητα αυτοί οι πολυμορφισμοί να επηρεάζουν τις μελέτες συσχέτισης (Wang 2002).

Ανιχνεύθηκε ο γονότυπος του πεπτιδίου σήματος του γονιδίου ACT στη θέση -15 σε 43 ασθενείς με αιμορραγικό ΑΕΕ και σε 50 μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν αυξημένη συχνότητα του γονότυπου ACT - 15T/T σε ασθενείς με αιμορραγικά ΑΕΕ.

Παρατηρήθηκε δηλαδή, πολύ μικρή στατιστικά, αύξηση η οποία δεν μπορεί να αξιολογηθεί λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών και μαρτύρων που ελέγχθηκαν.

Η μελέτη πρέπει να συνεχιστεί για να διευκρινιστεί το κατά πόσον η αυξημένη συχνότητα που παρατηρήθηκε για *πρώτη φορά σε Έλληνες ασθενείς* με αιμορραγικό ΑΕΕ είναι στατιστικά σημαντική.

Προτείνονται περαιτέρω μελέτες για να επιβεβαιώσουν τη συμβολή των πολυμορφισμών της ACT στον κίνδυνο εγκεφαλικής αιμορραγίας και για να αξιολογήσουν τη σχέση μεταξύ των γονότυπων της ACT και της δραστηριότητας της. Το σχετικό βάρος των γενετικών παραγόντων, πρέπει επίσης να αξιολογηθεί σε μεγαλύτερους πληθυσμούς ασθενών, με διαφορετικές πηγές αιμορραγίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Παπαδημητρίου Α, Χατζηγεωργίου Γ. Σημειώσεις Νευρογενετικής, Λάρισα 2002.

Παπαγεωργίου Κ. Νευρολογία, Β' Τόμος, Ειδικό μέρος, Αθήνα, 1992.

Ράπτης ΣΑ. Εσωτερική παθολογία. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιά-
νος ΓΚ. Αθήνα 1996.

Alter M.

Black-white differences in stroke frequency: challenges for research. Neuroepidemiology 1994; 13: 301-307.

American Academy of Neurology, Stroke, 2001.

Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME.
Notch signaling. Science 1995; 268 : 225-232.

Bao J, Sifers R, Kidd V, Ledley F, Woo SLCI.

Molecular evolution of serpins: homologous structure of the human α_1 -antichymotrypsin and α_1 -antitrypsin genes. Biochemistry 1981; 26: 7755-7799.

Brass L, Isaacsohn J, Merikangas K, Robinette C.

A study of twins and stroke. Stroke 1992; 23: 221-223.

Brass L, Page W, Lichtman J.

Stroke in twins III: a follow-up study. Stroke 1998; 29 (256).

Bruce U et al.

Granulocyte-Angiotensin System. Identification of angiotensinogen as the plasma protein substrate of leukocyte cathepsin G. *Biochemistry* 1984, 23: 227-232.

Byth B, Billingsley G, Cox D.

Physical and genetic mapping of the serpin gene cluster at 14q32.1: allelic association and a unique haplotype associated with α_1 -antitrypsin deficiency, *Am. J. Genet.* 1994; (55): 126-133.

DiMauro S.

Lessons from mitochondrial DNA mutations. *Semin Cell Dev Biol.* 2001; 12(6): 397-405.

Duranton J, Adam C, Bieth JG.

Kinetic mechanism of the inhibition of cathepsin G by α_1 -antichymotrypsin and α_1 -proteinase inhibitor. *Biochemistry* 1998; 37: 11239-11245.

Durany N, Ravid R, Riederer P, Cruz-Sanchez FF.

Increased frequency of the α_1 -antichymotrypsin T allele in cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathology* 2000; 20: 184-189.

eNOS Pharmaceutical, *Biology of Stroke*, 2001.

Ermolieff J, Duranton J, Petitou M, Bieth J.

Heparin accelerates the inhibition of cathepsin G by mucus proteinase inhibitor: potent effect of O-butyrylated heparin. *Biochem. J.* 1998; (330): 1369-1374.

Gendler S, Tokes Z.

Active proteinase inhibitors associated with human breast epithelial cells. *J Cell Biochem.* 1984; 26: 157-167.

Gilfix M, Briones L.

Absence of the A1252G mutation in α_1 -antichymotrypsin in a North American population suffering from dementia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1997; (17): 233-235.

Greco M, et al.

Nopeptide inhibitors of cathepsin G: Optimization of a novel β -ketophosphonoc acid lead by structure drug desing. *J. AM. CHEM. SOC.* 2002; (124): 3810-3811.

Hadjigeorgiou G, Kim S, Fischbeck K et al.

A new mitochondrial DNA mutation (A3288G) in the tRNA (Leu(UUR)) gene associated with familial myopathy. *J Neurol Sci.* 1999; 164: 153-157.

Haines L, Pritchard L, Saunders M, Schildkraut M, Growdon H, Gaskell C, Farrer A, Auerbach A, Gusella F, Locke A, Rosi L, Yamaoka L, Small W, Conneally M, Roses D, Pericak-Vance A.

No genetic effect of α_1 -antichymotrypsin in Alzheimer disease. *Genomics.* 1996; (33): 53-56.

Hassan A. and Markus H.

Genetics and ischaemic stroke. *Brain* 2000; 123: 1784-1812.

Herrmann S, Funke-Kaiser H, Schimdt-Petersen K et al.

Characterization of polymorphic structure of cathepsin G gene. Role in cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1538-1543.

Hof P, Mayr I, Huber R, Korzus E, Potempa J, Travis J, Powers JC, Bode W.

The 1.8 Å crystal structure of human cathepsin G in complex with Suc-Val-Pro-PheP-(OPh)²: a Janus-faced proteinase with two opposite specificities. *EMBO J* 1996; 15(20): 5481-91.

Hohn P, Popescu N, Hanson R, Salvesen G, Ley T.
Genomic organization and chromosomal localization of the human cathepsin G gene. *J Biol Chem* 1989; 264: 13412-13419.

Jousilahti P, Rastenyte D, Tuomilehto J, Sarti C, Vartiainen E.
Parental history of cardiovascular disease and risk of stroke. Aprospective follow-up of 14371 middle-aged men and women in Finland. *Stroke* 1997; 28: 1361-1366.

Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K et al.
Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996; 383: 707-710.

Joutel A, Tournier-Lasserre E.
Notch signaling pathway and human diseases. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9: 619-25.

Kalaria R.
Advances in molecular genetics and pathology of cerebrovascular disorders *Trends Neurosci* 2001; 24:392-400.

Kalsheker N.
 α_1 -antichymotrypsin *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1996; 28(9): 961-964.

Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST.
APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by α_1 -antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet* 1995;10(4): 486-488.

Kamboh I, Aston E, Ferrell E, Dekosky T.
Genetic effect of α_1 -antichymotrypsin on the risk of Alzheimer disease. (Letter) *Genomics* 1997; (41): 382-385.

Kelsey D, Abeliovich D, McMahon J, Whitehouse D, Corney G, Povey S, Hopkinson A, Wolfe J, Mieli-Vergani G, Mowat P.

Cloning of the human α_1 -antichymotrypsin gene and genetic analysis of the gene in relation to α_1 -antitrypsin deficiency. *J. Med. Genet.* 1988; (25): 36-368.

Kiely D, Wolf P, Cupples L, Beiser A, Myers R.

Familial aggregation of stroke. The Framingham Study. *Stroke* 1993; 24: 1366-1371.

Kittner S, White L, Losonczy K, Wolf P, Hebel J.

Black-white differences in stroke incidence in a national sample. The contribution of hypertension and diabetes mellitus. *JAMA* 1990; 264: 1267-1270.

Kraus J.

Biochemistry and molecular genetics of cystathionine beta-synthase deficiency. *Eur J Pediatr* 1998; 157(2): 50-53.

Lansbury P, Brice A.

Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Current Opinion in Genetics & Development* 2002; 12: 299-306.

Licastro F, Morini M, Polazzi E, Davis L.

Increased serum α_1 -antichymotrypsin in patients with probable Alzheimer's disease: an acute phase reactant without the peripheral acute phase response, *Journal of Neuroimmunology* 1995; (57): 71-75.

Markus H, Martin R, Simpson M et al.

Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology* 2002; 59: 1134-1138.

Matsubara E et al.

α_1 -antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol* 1990; (28): 561-567.

Morgan K, Licastro F, Tilley L, Ritchie A, Morgan L, Pedrini S, Kalsheker N.

Polymorphism in the α_1 -antichymotrypsin (ACT) gene promoter: effect on expression in transfected glial and liver cell lines and plasma ACT concentrations. *Hum. Genet.* 2001; (109): 303-310.

Muñoz E, Obach V, Oliva R, Martí M, Ezquerro M, Pastor P, Ballesta F, Tolosa E.

α_1 -Antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease MD. *Neurology* 1999; (52): 297.

Nacmias B et al.

Implication of α_1 -antichymotrypsin polymorphism in familial Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 1998; (244): 85-88.

Obach V, Revilla M, Vila N, Cervera A, Chamorro A.

α_1 -antichymotrypsin polymorphism: a risk factor for hemorrhagic stroke in normotensive subjects. *Stroke* 2001; 32(11): 2588-2591.

Ophoff R, Terwindt G, Vergouwe M.

Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4. *Cell* 1996; 87: 543-552.

Polanowska J, Krokoszynska I, Czapinska H, Watorek W, Dadlez M, Otlewski J.

Specificity of human cathepsin G. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998; (1386): 189-198.

Poller W, Faber J, Weidinger S, Tief K, Scholz S, Fischer M, Olek K, Kirchgesser M, Heidtman.

A leucine-to-proline substitution causes a defective α_1 -antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease. *Genomics* 1993; (17): 740-743.

Rastenyte D, Tuomilehto J, Sarti C.

Genetics of stroke. *Journal of Neurological Sciences* 1998;153: 132-145.

Rehault S, Bourdet M, Gauthier F.

New, Sensitive Fluorogenic Substrates for Human Cathepsin G Based on the Sequence of Serpin-reactive Site Loops. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(20): 13810-13817.

Renesto P, Si-Tahar M, Moniatte M, Balloy V, Van Dorsselaer A, Pidard D, Chignard M.

Specific Inhibition of Thrombin-Induced Cell Activation by the Neutrophil Proteinases Elastase, Cathepsin G, and Proteinase 3: Evidence for Distinct Cleavage Sites Within the Aminoterminal Domain of the Thrombin Receptor. *Blood* 1997; 89(6): 1944-1953.

Rubin H et al.

Cloning, expression, purification and biological activity of recombinant native and variant human α_1 -antichymotrypsins. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 2(265): 1199-1207.

Sambrano G, Huang W, Faruqi T, Mahrus S, Craik C, Cough S. Cathepsin G Activates Protease-activated Receptor-4 in Human Platelets. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(10): 6819-6823.

Sambrook, Fritsch, Maniatis.

Molecular Cloning - A LABORATORY MANUAL 1989.

Samilchuk I, Chuchalin G.

Missense mutation of α_1 -antichymotrypsin gene and chronic lung disease. (Letter) *Lancet* 1993; (342): 624.

Sarti C, Tuomilehto J, Salomaa V et al.

Epidemiology of subarachnoid hemorrhage in Finland from 1983 to 1985. *Stroke* 1991; 22: 848-853.

Selak M, Smith JB.

Cathepsin G binding to human platelets. Evidence for a specific receptor. *Biochem J* 1990; 2660: 55.

Selak M.

Cathepsin G and thrombin: Evidence for two different platelet receptors. *Biochem J* 1994; 297: 269.

Stanford University Stroke Center. *Understanding stroke*, 1999.

Stroke Center, *Cerebral Embolism Formation*, 2002.

Tachikawa H, Tsuda M, Onoe K, Ueno M, Takagi S, Shinohara Y. α_1 -antichymotrypsin gene A1252G variant (ACT Isehara-1) is associated with a lacunar type of ischemic cerebrovascular disease. *J. Hum. Genet.* 2001; (46): 45-47.

Tang G, Xie H, Xu L, Hao Y, Lin D, Ren D.

Genetic study of apolipoprotein E gene, α_1 -antichymotrypsin gene in sporadic Parkinson's disease. *Am J Med Genet* 2002; 114: 446-449.

The American Geriatrics Society, *Health and Age*.

Thom J.

Stroke mortality trends. An international perspective, *Ann. Epidemiol.* 1993; (3): 509-518.

Tournier - Lasserre E, Joutel A, Melki J et al.
Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat Genet* 1993; 3: 256-259.

Travis J, Salvasen G.
Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 1983; (52): 655-709.

Tsuda M, Sei Y, Yamamura M, Yamamoto M, Shinohara Y.
Detection of a new mutant α_1 -antichymotrypsin in patients with occlusive-cerebrovascular disease. *FEBS Lett.* 1992; (304): 66-68.

Vila N, Obach V, Revilla M, Oliva R, Chamorro A.
 α_1 -antichymotrypsin gene polymorphism in patients with stroke. *Stroke.* 2000; 31(9): 2103-2105.

Wang X, DeKosky S, Luedeking - Zimmer E, Ganguli M, Kamboh M.
Genetic variation in α_1 -antichymotrypsin and its association with Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* 2002; (1100): 356-365.

Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, Suematsu N, Otomo E, Macsushita M, Mizusawa H.
Association of α_1 -antichymocrypsin polymorphism with cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1998; (44): 129-131.

Yamamoto M, Kondo I, Ogawa N, Asanuma M, Yamashita Y, Mizuno Y.
Genetic association between susceptibility to Parkinson's disease and α_1 -antichymotrypsin polymorphism. *Brain Res.* 1997; (759): 153-155.

<http://www.kunmc.edu>

<http://www.cardioliving.com>

<http://www.vcu.edu>

<http://www.structuralmedicine.com>

<http://www.cardioliving.com>

<http://www.enospharm.com>

<http://www.geriatricsyllabus.com>

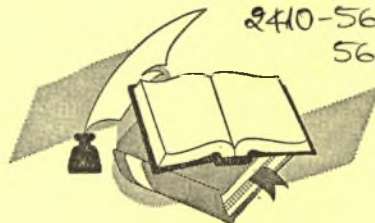


ΛΗΞΗ	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ

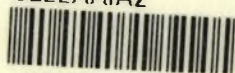
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

~~Τηλ.: 74.760.61~~ ΛΑΡΙΣΑ

2410-565077
565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057254