

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Με θέμα :

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ
(55L/M, 192Q/R και 311S/C)
ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΑΘΕΟΝΑΣΗΣ
(PON-1 και PON-2) ΣΕ ΙΣΧΑΙΜΙΚΑ
ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ**

του Τσακνάκη Γρηγόρη

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Γ. Χατζηγεωργίου, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.

Α. Παπαδημητρίου, Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.

Σ. Μπονάνου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Π.Θ.

ΛΑΡΙΣΑ 2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Ημερομ. 07.01.2003

Αριθ. Πρωτ. 2461

αρ. βιβ. 20/2003



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

Αριθ. Εισ.: 1595/1
Ημερ. Εισ.: 3-2-03
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2003
ΤΣΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Χατζηγεωργίου Γ., Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας για την καθοδήγηση, στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης τον κ. Παπαδημητρίου Α., Καθηγητή Νευρολογίας και την κ. Μπονάνου Σ., Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας για τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές τους για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Δαρδιώτη Θ. και Αγγελάκη Κ., ειδικευόμενους ιατρούς Νευρολογίας, για την πολύτιμη και ουσιαστική τους βοήθεια, στήριξη και συνεργασία.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραοξονάση (PON1) αποτελεί γλυκοπρωτεΐνη 43kDa, που βρίσκεται στην επιφάνεια των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL) και σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα των HDL στο αίμα. Είναι γνωστό ότι οι HDL επιδρούν αρνητικά ενώ οι LDL (χαμηλής περιεκτικότητας λιποπρωτεΐνες) θετικά στην ανάπτυξη της αρτηριοσκλήρυνσης. Η PON ασκεί προστατευτικό ρόλο έναντι της αρτηριοσκλήρωσης κυρίως μέσα από δύο μηχανισμούς:

- α) τον ανταγωνισμό στην οξειδωση των LDL και
- β) καταστροφή των προφλεγμονώδη μόρια που συμμετέχουν στην έναρξη της αρτηριοσκλήρωσης.

Το γονίδιο της PON1 βρίσκεται στη χρωμοσωμιακή θέση 7q21-22. Πρόσφατα έγινε γνωστό ότι δύο επιπλέον γονίδια (PON2 και PON3) κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ιδιότητες παραοξονάσης. Μέχρι σήμερα δύο πολυμορφισμοί (192 Q/R και 55L/M) στο PON1 και ένας (311 S/C) στο γονίδιο της PON2, έχουν μελετηθεί ως προς την επίδραση τους στα επίπεδα λιπιδίων του αίματος και την εμφάνιση ισχαιμίας του μυοκαρδίου. Αν και οι περισσότερες μελέτες δίνουν θετική συσχέτιση των πολυμορφισμών αυτών με την εμφάνιση ισχαιμίας του μυοκαρδίου, εντούτοις μερικές μελέτες δίνουν αρνητικά αποτελέσματα, πιθανόν λόγω διαφορετικού εθνολογικού υποβάθρου των εξετασθέντων πληθυσμών. Δεν έχει ακόμη διερευνηθεί η σχέση των ως άνω πολυμορφισμών με την εμφάνιση αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να μελετηθεί η συχνότητα και των τριών πολυμορφισμών σε υγιή πληθυσμό της Λάρισας (για πρώτη φορά στην Ελλάδα) και να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση τους με ασθενείς που θα εισαχθούν στο ΠΠΓΝΛ με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.

ΜΕΘΟΔΟΣ-ΥΛΙΚΟ

Στην μελέτη αυτή έλαβαν μέρος 47 ασθενείς με ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και 50 φυσιολογικοί μάρτυρες. Οι ασθενείς είχαν εισαχθεί διαδοχικά το 2002 στο Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας ενώ οι φυσιολογικοί μάρτυρες ήταν

επισκέπτες του νευρολογικού ιατρείου, όπου είχε αποδειχθεί ότι δεν έπασχαν από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ή άλλη μείζονα νευρολογικά πάθηση.

Η ανίχνευση των τριών πολυμορφισμών έγινε με την μέθοδο PCR/RFLP.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη μας, η οποία αποτελεί και την πρώτη μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό, βρέθηκε ότι η συχνότητα των γονότυπων PON1-55Leu/Leu (48.9%) και PON1-192Gln/Gln (53.2%), καθώς και των αλληλίων PON1-55Leu (70.2%) και PON1-192Gln (71.2%) εμφανίζεται να είναι αυξημένη στους ασθενείς με αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, σε αντίθεση με τον πολυμορφισμό PON2-311 όπου δεν υπάρχει διαφορά. Δεν γνωρίζουμε επί του παρόντος αν αυτές οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές και αυτό λόγω του μικρού δείγματος των ασθενών και μαρτύρων που μελετήθηκαν. Για να γίνει εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων θα πρέπει να αυξηθεί το δείγμα τόσο των μαρτύρων όσο και των ασθενών. Αυτό θα μας επιτρέψει επίσης να κάνουμε πολυπαραγοντική ανάλυση των αποτελεσμάτων για να αποκλειστεί η επίδραση άλλων παραγόντων κινδύνου για ΑΕΕ όπως για παράδειγμα, η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης, στα αποτελέσματά μας.

ABSTRACT

The human serum paraoxonase (PON1) is a high-density lipoprotein (HDL) associated esterase, which is supposed to protect low-density lipoprotein (LDL) against oxidation and to play a role in the development of atherosclerosis. PON1 is coded by a gene located on chromosome 7q21.3-22.1 in a cluster with two similar genes, PON2 and PON3.

Up-to-date, two common polymorphisms at codon 55 (L → M) and 192 (Q → R) in PON1 and one at codon 311 (C → S) in PON2 have been shown to be associated with plasma lipids concentrations and the risk for cardiovascular disease (CVD). The association between these polymorphisms and the risk for ischemic stroke has not been fully elucidated yet.

The purpose of this study was to study the frequency of those three polymorphisms, in consecutive stroke patients admitted to the Larissa University Hospital.

We studied 47 stroke patients matched to age and sex with 50 normal controls. PCR/RFLP methods were used to determine the three genetic polymorphisms in PON1 and PON2 genes.

Although our results suggest an association of the PON1 polymorphisms at codon 55 and 192 with ischaemic stroke, this has to be verified in a larger sample of stroke patients.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	1
-----------------------	---

Παράγοντες κινδύνου για Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια (ΑΕΕ)

Επιδημιολογικά στοιχεία

Κλινική εικόνα, διάγνωση και θεραπεία των ΑΕΕ

Παθολογική φυσιολογία της εστιακής εγκεφαλικής ισχαιμίας

Ο ρόλος της αθηρωμάτωσης

Γενετική των ΑΕΕ	9
-------------------------------	---

Μονογονιδιακά νοσήματα που σχετίζονται άμεσα με ισχαιμικά ΑΕΕ

Μελέτες συσχέτισης

Παραοξονάση (PON)	18
--------------------------------	----

Παραοξονάση 1 (PON1)

Παραοξονάση 2 (PON2)

Παραοξονάση 3 (PON3)

Πολυμορφισμοί στα γονίδια της παραοξονάσης

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ασθενείς	26
-----------------------	----

Τεχνικές	26
-----------------------	----

Αποτελέσματα	38
---------------------------	----

Συζήτηση	40
-----------------------	----

Βιβλιογραφία	46
---------------------------	----

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τον όρο Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο (ΑΕΕ) εννοούμε την παροδική ή μόνιμη δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, που έχει αιφνίδια εγκατάσταση και οφείλεται σε διαταραχή της αιμάτωσης του εγκεφάλου. Τα ΑΕΕ αποτελούν ένα ιδιαίτερα συχνό και σημαντικό πρόβλημα υγείας, κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες, καθώς αποτελούν την τρίτη σε συχνότητα αιτία θανάτου, μετά τις καρδιακές νόσους και τις νεοπλασίες. Επιπλέον είναι μία από τις πιο συνηθισμένες αιτίες νευρολογικών διαταραχών και αναπηριών, με πολύ σοβαρές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις¹. Μεγάλος αριθμός μελετών έχει γίνει για την κατανόηση της επιδημιολογίας, της αιτιολογίας και της παθογένειας των ΑΕΕ. Η συχνότητα τους είναι περίπου 2-3^ο/οο στο γενικό πληθυσμό, αλλά φτάνουν το 20 και το 50^ο/οο σε ηλικίες πάνω από 60 και 80 ετών αντίστοιχα².

Τα ΑΕΕ είναι αποτέλεσμα ρήξης (αιμορραγικά) ή απόφραξης (ισχαιμικά) ενός μεγάλου, μεσαίου ή μικρού μεγέθους εγκεφαλικού αγγείου συνήθως αρτηριακού κλάδου. Ανεξάρτητα από τον μηχανισμό της εμφάνισης του ΑΕΕ (ρήξη ή απόφραξη) αυτό οδηγεί σε κατάργηση της αιματικής ροής σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Ανάλογες με το αγγείο που προσβάλλεται είναι και οι κλινικές εκδηλώσεις του ΑΕΕ. Έτσι για παράδειγμα, εάν προσβληθεί αγγείο που αρδεύει κινητικές περιοχές του εγκεφάλου τότε ο ασθενής θα έχει κινητικές διαταραχές του τύπου ημιπάρεσης (μερική κατάργηση της κινητικότητας στο άνω και κάτω άκρο ομόπλευρα) ή ημιπληγίας (πλήρης κατάργηση), ενώ όταν προσβληθεί αγγείο που αρδεύει οπτικά κέντρα του εγκεφάλου τότε ο ασθενής θα εμφανίζει διαταραχές της όρασης, ενώ η κινητικότητα θα είναι ανέπαφη¹.

Το κλινικό αποτέλεσμα της απόφραξης ή της ρήξης ενός εγκεφαλικού αγγείου είναι το ίδιο, διότι και στις δύο περιπτώσεις επέρχεται νέκρωση των νευρικών κυττάρων που αρδεύονται από το προσβεβλημένο αγγείο. Τα παθολογοανατομικά και παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των ισχαιμικών και των αιμορραγικών ΑΕΕ όμως διαφέρουν σημαντικά¹.

Τα ισχαιμικά διαχωρίζονται :

- σε αθηρωματικά, που είναι συνήθως αποτέλεσμα ανάπτυξης αθηρωμάτωσης των εγκεφαλικών αγγείων και
- σε εμβολικά που μπορεί να οφείλονται:
 - α) σε απόσπαση αθηρωματικού θρόμβου από τις αθηρωματικές πλάκες του καρωτιδικού ή σπονδυλοβασικού συστήματος και
 - β) σε μεταφορά του θρόμβου από τις καρδιακές κοιλότητες.

Τα αιμορραγικά ΑΕΕ μπορεί να είναι αποτέλεσμα ρήξεως αγγείου από απότομη αύξηση της αρτηριακής πίεσης ή ρήξεως προϋπάρχοντος μικρού ή μεγάλου ανευρύσματος των αγγείων του ΚΝΣ. Το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση ενδοεγκεφαλικής ή υπαραχνοειδούς αιμορραγίας.

Πίνακας 1. Είδη αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων³.

<ul style="list-style-type: none">● Ισχαιμικά<ul style="list-style-type: none">➤ Θρομβωτικά➤ Εμβολικά<ul style="list-style-type: none">-- Αγγειογενούς αιτιολογίας-- Καρδιογενούς αιτιολογίας● Αιμορραγικά<ul style="list-style-type: none">➤ Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία➤ Υπαραχνοειδής αιμορραγία

Παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ

Η αρτηριακή υπέρταση, τα καρδιολογικά νοσήματα και κυρίως οι αρρυθμίες, ο σακχαρώδης διαβήτης, το κάπνισμα, η παχυσαρκία και οι υπερλιπιδαιμίες είναι γνωστοί παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ. Παρόλο που προδιαθέτουν τόσο για

ισχαιμικά όσο και για αιμορραγικά ΑΕΕ εντούτοις, μερικοί παράγοντες συνδέονται περισσότερο με ένα είδος ΑΕΕ.

Η υπέρταση για παράδειγμα, αποτελεί ισχυρότερο παράγοντα κινδύνου για αιμορραγικό παρά για ισχαιμικό ΑΕΕ, ενώ η κολπική μαρμαρυγή (συχνό είδος καρδιακής αρρυθμίας) προδιαθέτει συνήθως για εμβολικά ισχαιμικά ΑΕΕ. Επιπλέον παράγοντες κινδύνου είναι οι αιματολογικές διαταραχές και η λήψη αντισυλληπτικών δισκίων. Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία εμφανίζουν συχνά ισχαιμικά ΑΕΕ, πολλές φορές θανατηφόρα. Αιματοκρίτης πάνω από 55% και λευκοκύτταρα περισσότερα από 500000/μl αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, ενώ η χρησιμοποίηση αντισυλληπτικών δισκίων με συνδυασμούς προγεστερόνης - οιστρογόνων τριπλασιάζει τον κίνδυνο μεταξύ γυναικών της παραγωγικής ηλικίας¹.

Επιδημιολογικά στοιχεία

Τα ΑΕΕ αποτελούν παγκόσμιο νόσημα με σημαντικές διαφορές της συχνότητάς τους σε διάφορες χώρες. Αποτελούν την τρίτη αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες και τον καρκίνο. Τα ισχαιμικά ΑΕΕ είναι 3 - 4 φορές πιο συχνά από ότι τα αιμορραγικά και αντιστοιχούν στο 70-80% όλων των ΑΕΕ. Η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία αντιστοιχεί στο 10-30% των περιπτώσεων και εξαρτάται από τη γεωγραφική καταγωγή των ασθενών, με μεγαλύτερες συχνότητες να έχουν καταγραφεί στους Κινέζους και στους Γιαπωνέζους. Η συχνότητα της υπαραχνοειδούς αιμορραγίας αποτελεί συνήθως το 1/3-1/2 της ενδοεγκεφαλικών αιμορραγιών και εμφανίζει αυξημένη συχνότητα στην Φινλανδία⁴.

Σκοπός των περισσότερων επιδημιολογικών μελετών είναι ο υπολογισμός της επίπτωσης και του επιπολασμού των ΑΕΕ. Η επίπτωση προσδιορίζεται από τον αριθμό των εγκεφαλικών που συνέβησαν για πρώτη φορά σε έναν καθορισμένο χρόνο σε έναν καθορισμένο πληθυσμό, ενώ ο επιπολασμός αναφέρεται στον ολικό αριθμό των περιπτώσεων, νέων και παλιών, σε δεδομένο χρόνο, επίσης σε έναν καθορισμένο πληθυσμό. Η American Heart Association εκτιμά ότι στις ΗΠΑ, υπάρχουν περίπου 4 εκατομμύρια επιζώντες από ΑΕΕ (επιπολασμός) και περίπου

600000 καινούρια περιστατικά (επίπτωση) συμβαίνουν κάθε χρόνο⁴. Γενικά, τα ποσοστά εμφάνισης κυμαίνονται μεταξύ 100 και 300 ανά 100000 άτομα ανά χρόνο.

Η πρωτοπαθής ενδοεγκεφαλική αιμορραγία είναι λιγότερο συχνή στις δυτικές χώρες από ότι στην Ιαπωνία και πιθανόν στην Κίνα⁵. Στην Ινδία, υπάρχουν μερικές ενδείξεις ότι τα ΑΕΕ είναι ιδιαίτερος συχνά στις νεαρές ηλικίες. Τόσο στις ΗΠΑ όσο και στην Αγγλία η θνησιμότητα είναι υψηλότερη στους μαύρους από ότι στους λευκούς (περίπου 2,4 φορές μεγαλύτερη), όπως επίσης και στους Ισπανόφωνους (περίπου 1,6 φορές)⁴. Στην Ιαπωνία, τα ΑΕΕ είναι η κύρια αιτία θανάτου στους ενήλικες και οι αιμορραγίες είναι πιο συχνές από ότι η αθηροθρόμβωση. Στις ΗΠΑ η θνησιμότητα έχει αρχίσει να ελαττώνεται από την αρχή του 20^{ου} αιώνα. Μέχρι το 1969 ο ρυθμός μείωσης ήταν 1% ανά χρόνο, ενώ αργότερα έφτασε το 5%. Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στα ηλικιωμένα άτομα. Ο λόγος για την τάση αυτή παραμένει ένα αμφιλεγόμενο θέμα⁴.

Τα επιδημιολογικά στοιχεία υποστηρίζουν διάφορες πιθανότητες, όπως η μείωση της συχνότητας εμφάνισης των ΑΕΕ, η μείωση στην ένταση με την οποία εκδηλώνονται, τα βελτιωμένα διαγνωστικά κριτήρια και ο καλύτερος έλεγχος των παραγόντων κινδύνου. Μερικοί ερευνητές έχουν αποδώσει την μείωση στη θνησιμότητα που προκαλείται από τα ΑΕΕ στον καλύτερο έλεγχο της υπέρτασης, ενώ άλλοι έχουν παρατηρήσει ότι η μείωση άρχισε πριν την ευρεία διάδοση των αντιυπερτασικών παραγόντων. Γενικότερα, τα ΑΕΕ είναι υπεύθυνα για το 10% όλων των θανάτων στις αναπτυγμένες χώρες και οι περισσότεροι από τους θανάτους αυτούς συμβαίνουν σε άτομα άνω των 65 ετών⁴.

Κλινική εικόνα, διάγνωση και θεραπεία των ΑΕΕ

Παρόλο που ,όπως έχει αναφερθεί, η κλινική εικόνα των ΑΕΕ καθορίζεται βασικά από την ανατομική περιοχή του εγκεφάλου που θα προσβληθεί, εντούτοις υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα αιμορραγικά και ισχαιμικά ΑΕΕ τόσο στον τρόπο εμφάνισης όσο και στην βαρύτητα, που επιτρέπουν στο κλινικό γιατρό να υποθέσει με αρκετή ακρίβεια το είδος του ΑΕΕ¹.

Το βασικό χαρακτηριστικό της ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας είναι η αιφνίδια εγκατάσταση, χωρίς πρόδρομα συμπτώματα σε αντίθεση με τα θρομβωτικά ισχαιμικά

ΑΕΕ όπου η εγκατάσταση είναι συνήθως προοδευτική (εγκαθίσταται σε λίγα λεπτά ή ώρες). Όταν η αιμορραγία είναι μεγάλη επιφέρει αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης και ο ασθενής εμφανίζει κεφαλαλγία, εμετούς και διαταραχή του επιπέδου συνείδησης, ενώ δεν είναι σπάνια η άμεση επέλευση κόματος.

Η υπαραχνοειδής αιμορραγία οφείλεται συνήθως σε ρήξη ανευρύσματος ή μικρού αγγείου, στον υπαραχνοειδή χώρο (κάτω από την αραχνοειδή μήνιγγα) σε αντίθεση με την ενδοεγκεφαλική αιμορραγία όπου η εξαγγείωση του αίματος γίνεται μέσα στην εγκεφαλική ουσία. Εμφανίζεται συνήθως μετά από έντονη σωματική άσκηση και εισβάλλει με οξύ και διαξιφιστικό πονοκέφαλο.

Τα εμβολικά ισχαιμικά ΑΕΕ εκδηλώνονται αιφνιδίως και η κλινική τους διαφοροδιάγνωση από την ενδοεγκεφαλική αιμορραγία είναι αρκετές φορές δύσκολη. Η παρουσία κολπικής μαρμαρυγής υποδηλώνει συνήθως εμβολικό επεισόδιο.

Τα θρομβωτικά ισχαιμικά ΑΕΕ εκδηλώνονται συχνά με προοδευτική νευρολογική σημειολογία σε διάστημα λεπτών ή ωρών. Μπορεί να εκδηλωθούν και σαν παροδικά (αναστρέψιμα) ΑΕΕ, που διαρκούν λιγότερο από 24 ώρες. Η εμφάνιση ενός παροδικού ΑΕΕ συνήθως αποτελεί ισχυρή ένδειξη αθηρωματικής νόσου και επερχόμενου σοβαρού ΑΕΕ τους επόμενους μήνες.

Η διάγνωση των ΑΕΕ στηρίζεται βέβαια στην κλινική εικόνα αλλά τίθεται οριστικά με την απεικόνιση της αιμορραγίας ή της ισχαιμίας στην αξονική τομογραφία εγκεφάλου σαν υπέρπυκνη ή υπόπυκνη περιοχή αντίστοιχα.

Η έγκαιρη διάγνωση των ΑΕΕ αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση των ασθενών. Η διαφοροδιάγνωση του ισχαιμικού από το αιμορραγικό ΑΕΕ πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν γρηγορότερα, γιατί διαφέρει η θεραπευτική αντιμετώπιση τόσο του ΑΕΕ, όσο και των αναμενόμενων επιπλοκών.

Η αντιμετώπιση τους, ανεξαρτήτως του είδους και της βαρύτητας πρέπει να γίνεται σε οργανωμένες νοσηλευτικές μονάδες. Πέραν από τα γενικά μέτρα υποστήριξης του ασθενούς (καλή ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, της αναπνοής και της καρδιακής λειτουργίας) στα ισχαιμικά ΑΕΕ χορηγούνται αντι-αιμοπεταλιακά φάρμακα, καθώς και φάρμακα υποβοηθητικά της κυκλοφορίας, ενώ στα αιμορραγικά ΑΕΕ χορηγούνται συνήθως φάρμακα για να προληφθεί η εμφάνιση εγκεφαλικού οιδήματος το οποίο μπορεί να είναι απειλητικό για την ζωή του ασθενούς. Στις περιπτώσεις όπου το ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα είναι μεγάλο και πιέζει σημαντικούς ενδοεγκεφαλικούς σχηματισμούς τότε ενδεχομένως να χρειαστεί και χειρουργική αντιμετώπιση. Για την υπαραχνοειδή αιμορραγία η θεραπεία είναι συντηρητική στα

αρχικά στάδια αλλά σε περίπτωση που αυτή οφείλεται σε ρήξη ανευρύσματος τότε η χειρουργική αντιμετώπιση είναι αναγκαία¹.

Παθολογική φυσιολογία της εστιακής εγκεφαλικής ισχαιμίας

Με τον όρο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο εννοούμε τη διαταραχή της λειτουργίας του εγκεφαλικού ιστού, λόγω σημαντικής μείωσης ή διακοπής της παροχής οξυγόνου και γλυκόζης σαν αποτέλεσμα μείωσης ή διακοπής της εγκεφαλικής αιματικής ροής σε μία συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου¹.

Κατά την απόφραξη ενός αγγείου, η ισχαιμούσα περιοχή δεν νεκρώνεται αμέσως, αλλά μεσολαβεί ένας λανθάνων χρόνος, στη διάρκεια του οποίου επέρχεται τοπική αγγειοδιαστολή και αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου από τον ισχαιμούντα ιστό. Εφόσον παραταθεί η ισχαιμία, ξεκινά πλέον η διαδικασία της κυτταρικής νέκρωσης. Το διάστημα που μεσολαβεί από την απόφραξη του αγγείου μέχρι την έναρξη των νεκρωτικών αλλοιώσεων ονομάζεται θεραπευτικό παράθυρο, διότι θεωρητικά η άμεση θεραπευτική παρέμβαση στη διάρκειά του θα απέτρεπε την κυτταρική νέκρωση. Η διάρκεια του θεραπευτικού παραθύρου υπολογίζεται σε 10-12 λεπτά.

Η ισχαιμούσα περιοχή περιλαμβάνει μία κεντρική ζώνη, που χαρακτηρίζεται από νέκρωση των νευρώνων, της γλοίας και του ενδοθηλίου των αγγείων, και μια περιφερική ζώνη, που αιματώνεται μερικώς από την παράπλευρη κυκλοφορία και όπου τα κύτταρα υπολειτουργούν. Η περιφερική αυτή ζώνη ονομάζεται λυκοφωτική περιοχή (penumbra)¹.

Το ποσοστό των κυττάρων της περιοχής που τελικά επιβιώνουν, καθορίζει τόσο την εξέλιξη της κλινικής εικόνας του οξέος ΑΕΕ, όσο και της πρόγνωσης του. Λόγω μειωμένης παροχής οξυγόνου εξαιτίας της ισχαιμίας, ο μεταβολισμός της γλυκόζης ακολουθεί την οδό της αναερόβιας γλυκόλυσης, η οποία έχει ως τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τοπική μεταβολική οξέωση και στη συνέχεια κυτταρική νέκρωση.

Σημαντικός επιβαρυντικός παράγοντας του ΑΕΕ είναι το οίδημα που αναπτύσσεται γύρω από την ισχαιμούσα περιοχή. Αυτό επιδεινώνει την ισχαιμία, τόσο διότι πιέζει τα αρτηρίδια και τριχοειδή της περιοχής, όσο και λόγω της πίεσης που ασκεί στα φλεβίδια, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αποχέτευσης του

φλεβικού αίματος. Το οίδημα εκδηλώνεται 24-96 ώρες μετά την εγκατάσταση της ισχαιμίας¹.

Ο ρόλος της αθηρωμάτωσης

Η αθηρωμάτωση είναι το πιο συνηθισμένο εκφυλιστικό αγγειακό υπόστρωμα στα οξέα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια. Βασικοί προδιαθεσικοί παράγοντες για αθηρωμάτωση είναι η κληρονομική προδιάθεση, η αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης και η υπερλιπιδαιμία².

Ιστολογικά χαρακτηριστικά της αθηρωμάτωσης είναι η πάχυνση του έσω χιτώνα, από ινώδη ιστό και η ατροφία του μέσου χιτώνα με απώλεια της στοιβάδας του λείου μυϊκού ιστού και με συγκέντρωση βλεννοπρωτεϊνών. Αυτές οι διαταραχές είναι κυρίως έκδηλες στις μεγάλες αρτηρίες και οδηγούν συχνά στην εμφάνιση των αθηρωματικών πλακών. Η εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών που οδηγεί στο σχηματισμό αιμοπεταλιακών θρόμβων είναι δυνατόν να προκαλέσει περαιτέρω στένωση του αρτηριακού αυλού ή μπορεί να αποσπασθούν και να προκαλέσουν εμβολικό ΑΕΕ. Για την ανάπτυξη των πλακών υπάρχουν διάφορες θεωρίες².

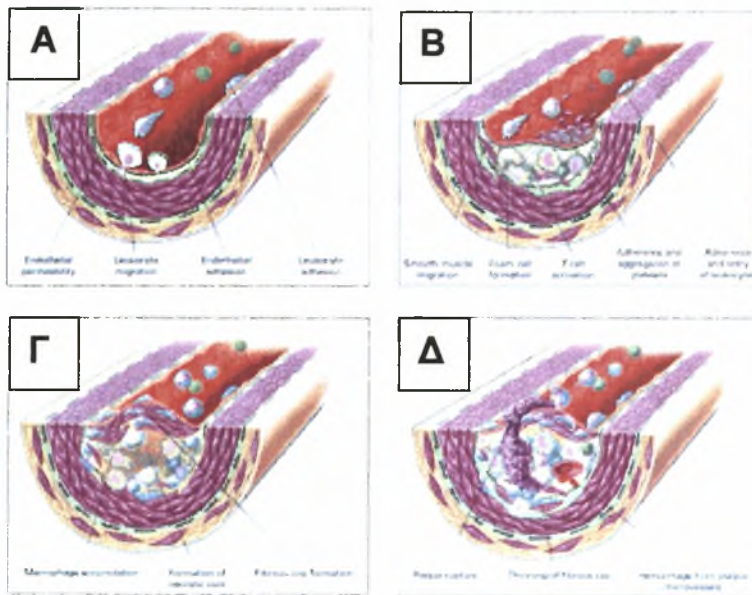
Η *λιπογενής θεωρία* συσχετίζει την ανάπτυξη των πλακών με την υπερλιπιδαιμία και παγίδευση λιπιδίων μέσα από το ενδοθήλιο, πράγμα που επιταχύνεται με την περίσσεια λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL).

Η *μυογενής θεωρία* βασίζεται στην μετανάστευση και στον πολλαπλασιασμό των μυοκυττάρων στον έσω χιτώνα, με δευτερογενή συγκέντρωση λιπιδίων. Και οι δύο θεωρίες για την ανάπτυξη των πλακών δίνουν έμφαση στην προϋπαρξη αλλοιωμένου και αυξημένου σε διαπερατότητα ενδοθηλίου.

Η *θρομβογενής θεωρία* θεωρεί την αλλοίωση του ενδοθηλίου πρωταρχική βλάβη για την ανάπτυξη των αθηρωματωδών πλακών με αύξηση της συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων και εναπόθεση ινώδους ιστού. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων ενοχοποιείται και στη μυογενή θεωρία ως στοιχείο που ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των μυοκυττάρων.

Όσο αφορά την εγκεφαλική κυκλοφορία, βαθύτερες αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις προσβάλλουν κυρίως τις μεγάλες αρτηρίες στη βάση του εγκεφάλου, τις μεγάλες εξωκρανικές αρτηρίες (καρωτίδες, σπονδυλικές) τα εκφυτικά τρήματα των

υποκλείδιων αγγείων και το αορτικό τόξο. Οι μικρές αρτηρίες του εγκεφάλου εμφανίζουν κυρίως ινώδη πάχυνση του τοιχώματος. Οι αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις στα αγγεία που αρδεύουν τον εγκέφαλο μπορεί να οδηγήσουν σε αγγειοστένωση, σε ενδοαγγειακή θρόμβωση ή σε εμβολή από απόσπαση θρόμβων ή υλικού πλουσίου σε χοληστερόλη, με συνέπεια την ισχαιμία ή την εγκατάσταση εμφράκτου. Μπορεί επίσης να οδηγήσουν στη δημιουργία ατρακτοειδών διευρύνσεων, με συνέπεια τη ρήξη του αγγειακού τοιχώματος και την αιμορραγία².



Εικόνα 1. Τα στάδια της αθηρωμάτωσης⁶.

A) Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου στην αθηρωμάτωση.

B) Εναπόθεση λιποειδών.

Γ) Σχηματισμός μίας προχωρημένης και περίπλοκης αθηρωματικής βλάβης.

Δ) Δημιουργία ασταθών ινώδων αθηρωματωδών πλακών στην αθηρωμάτωση.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΕΕ

Τα ΑΕΕ μπορεί να εμφανιστούν:

α) σαν κληρονομικές μορφές, κυρίως επικρατητικές, σε περιπτώσεις ενός μονογονιδιακού νοσήματος που προδιαθέτει για την εμφάνισή τους και
β) σαν σποραδικά επεισόδια (που είναι και τα περισσότερα) που είναι συνήθως το αποτέλεσμα επίδρασης πολλαπλών παραγόντων (γενετικών και περιβαλλοντικών). Η συμμετοχή διαφόρων γενετικών παραγόντων και η ιδιαίτερα η αλληλεπίδραση τους με περιβαλλοντικούς παράγοντες στην παθογένεια των ΑΕΕ (σποραδικών και κληρονομικών) αποτελεί σήμερα παγιωμένη επιστημονική άποψη.

Οι γενετικές μελέτες θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τον προσανατολισμό τους. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι μελέτες που έχουν σκοπό να ανακαλύψουν παθογόνα γονίδια που προκαλούν κληρονομικές μορφές ΑΕΕ, ενώ στην δεύτερη κατηγορία συγκαταλέγονται οι λεγόμενες μελέτες συσχέτισης των ΑΕΕ με γενετικούς πολυμορφισμούς σε γονίδια που ενδεχομένως εμπλέκονται στην παθογένεια των ΑΕΕ είτε σαν προδιαθεσικοί, είτε σαν τροποποιητικοί παράγοντες⁷.

1. Μονογονιδιακά νοσήματα που σχετίζονται άμεσα με ισχαιμικά ΑΕΕ

Τα μονογονιδιακά νοσήματα που σχετίζονται με ισχαιμικά ΑΕΕ θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε νοσήματα που προδιαθέτουν στην εμφάνιση καρδιοεμβολικών επεισοδίων, σε νοσήματα που προσβάλλουν τις μεγάλες αρτηρίες, τα μικρά αγγεία, τους ιοντικούς διαύλους, καθώς και σε μεταβολικά νοσήματα, όπως είναι η νόσος Fabry και το σύνδρομο MELAS⁷.

1.1 Καρδιοεμβολικά επεισόδια

Τα καρδιοεμβολικά επεισόδια είναι το αποτέλεσμα μεταφοράς, μέσω της κυκλοφορίας, ενός θρόμβου που έχει σχηματιστεί μέσα στις αριστερές καρδιακές κοιλότητες, σε κάποια εγκεφαλική αρτηρία την οποία και αποφράσσει. Διάφορα νευρομυϊκά νοσήματα που προκαλούν μυοκαρδιοπάθεια, όπως η μυϊκή δυστροφία Duchenne, προκαλούν καρδιακή ανεπάρκεια η οποία αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για εμβολικό ΑΕΕ καρδιογενούς αιτιολογίας. Το ίδιο ισχύει και για τις

οικογενείς μορφές κολπικού μυξώματος (αυτοσωματικές επικρατείς ή υπολειπόμενες)⁸.

1.2 Νοσήματα μεγάλων αρτηριών

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται κυρίως η ομοκυστεϊνουρία και οι δυσλιπιδαιμίες, δύο νοσήματα που συνδέονται με αθηρωμάτωση των ενδοκρανιακών και εξωκρανιακών αρτηριακών εγκεφαλικών κλάδων, με αποτέλεσμα να προκαλούν ισχαιμικά ΑΕΕ.

1.2.1 Ομοκυστεϊνουρία

Η ομοκυστεϊνουρία χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα και τα ούρα. Οφείλεται σε ενζυμική διαταραχή του μεταβολισμού της ομοκυστεΐνης και είναι αποτέλεσμα γενετικών βλαβών. Υπάρχουν διάφορες κληρονομικές (αυτοσωματικές επικρατείς ή υπολειπόμενες) μορφές και πρέπει να διαχωρίζονται από την υπερομοκυστεϊναιμία χωρίς ομοκυστεϊνουρία, η οποία χαρακτηρίζεται από μικρή αύξηση της ομοκυστεΐνης στο αίμα και πιθανολογείται ότι και αυτή προδιαθέτει σε αθηρωμάτωση. Η κληρονομικότητα της υπερομοκυστεϊναιμίας δεν είναι σαφής.

Η ομοκυστεϊνουρία εκδηλώνεται κλινικά με νοητική στέρηση, σκελετικές διαταραχές και ΑΕΕ σε ηλικία κάτω των 30 ετών. Η συχνότερη ενζυμική διαταραχή είναι η ανεπάρκεια της β-συνθάσης της κυσταθειόνης {cystathione β-synthase (CS)} η οποία καταλύει την μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε κυσταθειόνη με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στο αίμα ομοκυστεΐνη και μεθειονίνη. Η ομοκυστεΐνη πιθανολογείται ότι έχει αθηρωματική δράση μέσω τοξικής δράσης στο ενδοθήλιο των αρτηριών. Το 30% περίπου των ασθενών με ανεπάρκεια της CS εμφανίζουν τουλάχιστον ένα ΑΕΕ^{7,9}.

1.2.2 Δυσλιπιδαιμίες

Οι κληρονομικές διαταραχές των λιπιδίων και ιδιαίτερα η διαταραχή του μεταβολισμού της χοληστερίνης είναι γνωστό, από πολλά χρόνια, ότι αποτελούν σοβαρούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ισχαιμικών ΑΕΕ, οικογενούς μορφής. Η οικογενής υπο-Α-λιποπρωτεΐναιμία και η οικογενής υπερχοληστεριναιμία αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα κληρονομικών δυσλιπιδαιμιών που προκαλούν ΑΕΕ^{7,10,11}.

1.2.3 Αιματολογικά νοσήματα

Στα αιματολογικά νοσήματα που προκαλούν ισχαιμικά ΑΕΕ περιλαμβάνονται η δρεπανοκυτταρική αναιμία και διάφορες μορφές προθρομβωτικών καταστάσεων όπως είναι η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C, της πρωτεΐνης S και της αντιθρομβίνης III.

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία αποτελεί αυτόσωμο υπολειπόμενο νόσημα, ανήκει στις αιμοσφαιρινοπάθειες, χαρακτηρίζεται από την ομόζυγη παρουσία της αιμοσφαιρίνης S και οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-αιμοσφαιρίνης στη χρωμοσωμιακή θέση 11p15.5. Σε μικρό ποσοστό (<10%) παιδιών ηλικίας κάτω των 14 ετών, η νόσος επιπλέκεται με θρομβωτικά ΑΕΕ τα οποία είναι αποτέλεσμα τόσο της απόφραξης των μικρών και μεγάλων αγγείων από δρεπανοκύτταρα κατά την διάρκεια δρεπανοκυτταρικής κρίσης, όσο και στην ανάπτυξη ινώδους ιστού στον μέσο χιτώνα των ενδοεγκεφαλικών και εξωεγκεφαλικών αγγείων, ο οποίος διαταράσσει τη διάμετρο του αγγειακού αυλού¹².

Η πρωτεΐνη C, η πρωτεΐνη S και η αντιθρομβίνη III είναι φυσικοί αντιπηκτικοί παράγοντες και η ανεπάρκεια τους αποτελεί γνωστό παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση οικογενούς μορφής θρόμβωσης των εν τω βάθει φλεβών. Η σχέση τους με τα ΑΕΕ είναι τεκμηριωμένη μόνο για τα ισχαιμικά ΑΕΕ σε νέους. Είναι ενδιαφέρον ότι η μετάλλαξη A1691G στον παράγοντα πήξεως Leiden V σχετίζεται με αυξημένη αντίσταση στην πρωτεΐνη C¹³ ενώ η μετάλλαξη G20210A στο γονίδιο της προθρομβίνης σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα της προθρομβίνης¹⁴. Σε μερικές οικογένειες με ιστορικό αρτηριακής θρόμβωσης έχει περιγραφεί επιστατική (συνεργική) αλληλεπίδραση των δύο γονιδίων, αποτελεί δηλαδή χαρακτηριστικό παράδειγμα αλληλεπίδρασης δύο μεταλλάξεων που προδιαθέτουν στην εμφάνιση μίας νόσου⁷.

Τα αντιφωσφολιπιδικά σύνδρομα αποτελούν μία ετερογενή ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από την παρουσία αντισωμάτων έναντι διαφόρων φωσφολιπιδίων. Στις κλινικές εκδηλώσεις τους συχνά περιλαμβάνονται η φλεβική και αρτηριακή θρόμβωση. Τα αντισώματα αυτά πρέπει να τα αναζητούμε σε ισχαιμικά ΑΕΕ, ιδιαίτερα σε νέους. Παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις για αυτοσωματική επικρατητική κληρονομικότητα σε αυτά τα νοσήματα εν τούτοις, μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί κανένα υπεύθυνο γονίδιο^{15,7}.

1.3 Νοσήματα μικρών αγγείων (αρτηριών και αρτηριολίων)

Με τον όρο νοσήματα των μικρών αγγείων εννοούμε εκείνες τις παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από προσβολή των βασικών γαγγλίων και της εν τω βάθει λευκής ουσίας του εγκεφάλου και που οφείλονται σε απόφραξη των μικρών αρτηριών και αρτηριολίων που αρδεύουν τις πιο πάνω περιοχές. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνεται κυρίως, το σύνδρομο CADASIL.

1.3.1 Σύνδρομο CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy*)

Το σύνδρομο αυτό (εγκεφαλική αυτόσωμη επικρατής αρτηριοπάθεια με υποφλοιώδη έμφρακτα και λευκοεγκεφαλοπάθεια) προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *Notch-3*, το οποίο συνδέθηκε με την γονιδιακή θέση 19q12. Το *Notch-3* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ενός διαμεμβρανικού υποδοχέα ο οποίος πιθανολογείται ότι έχει χαρακτήρα αναπτυξιακού παράγοντα. Συμμετέχει στην διακυτταρική επικοινωνία και η παρουσία του θεωρείται σημαντική κατά την εμβρυϊκή ζωή ενώ στους ενήλικες η ακριβής της λειτουργία είναι άγνωστη.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το *Notch-3* εκφράζεται κύρια στην κυτταρική μεμβράνη των λείων μυϊκών ινών των μικρών αγγείων και πιθανολογείται ότι συμμετέχει στα τελικά στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών.

Οι μεταλλάξεις εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα, έως 70%, στα εξόνια 3 και 4, γεγονός που υποδεικνύει την μεγάλη λειτουργική σημασία των εξονίων αυτών. Κλινικά οι ασθενείς εμφανίζουν υποφλοιώδη μικροαγγειοπάθεια παρουσία μικρών εμφράκτων περικοιλιακά χωρίς να εμφανίζουν προδιαθεσικούς παράγοντες (υπερλιπιδαιμία, υπέρταση) με προοδευτική εγκατάσταση υποφλοιώδους άνοιας και ψευδοπρομηκικού συνδρόμου. Εμφανίζεται κυρίως σε ενήλικες και σπανίως οι ασθενείς ξεπερνούν την ηλικία των 65 ετών. Χαρακτηρίζεται επίσης από την παρουσία ημικρανίας ή ψυχικών διαταραχών αρκετά χρόνια πριν την έναρξη της νόσου.

Η διάγνωση στηρίζεται στο κληρονομικό ιστορικό, στην χαρακτηριστική εικόνα λευκοεγκεφαλοπάθειας (νόσος κατά την οποία επέρχεται εκφύλιση της λευκής ουσίας του εγκεφάλου) στην μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και στην ανεύρεση χαρακτηριστικών αλλοιώσεων στη βιοψία δέρματος, δηλαδή εναπόθεση αγνώστου συστάσεως κοκκιώδους ιστού¹⁶.

1.4 Νοσήματα ιοντικών διαύλων

Τα νοσήματα των ιοντικών διαύλων περιλαμβάνουν μια ομάδα νευρολογικών νοσημάτων τα οποία χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση παροξυσμικών συμπτωμάτων. Σε αυτά περιλαμβάνονται διάφορα ετερογενή νοσήματα όπως είναι μερικές μορφές επιληψίας, η ημικρανία, η υποκαλιαμική και η υπερκαλιαμική παράλυση.

1.4.1 Οικογενής ημιπληγική ημικρανία

Η οικογενής ημιπληγική ημικρανία αποτελεί σπάνια μορφή ημικρανίας η οποία χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση παροδικής ημιπληγίας λίγο πριν την εμφάνιση της ημικρανίας. Η ημιπληγία είναι παροδική και πλήρως αναστρέψιμη. Μπορεί να εμφανιστεί αρκετές φορές στην διάρκεια της ζωής ενός ατόμου. Τα συμπτώματα αυτά αποδίδονται σε παροδική ισχαιμία σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου λίγο πριν εμφανιστεί η ημικρανία. Ασθενείς που εμφανίζουν αυτή την μορφή ημικρανίας έχουν αυξημένο κίνδυνο για ισχαιμικό ΑΕΕ κατά την διάρκεια της ζωής τους.

Το 1993 εντοπίστηκε το υπεύθυνο γονίδιο στο χρωμόσωμα 19 και τρία χρόνια αργότερα αποκωδικοποιήθηκε και περιγράφηκαν οι πρώτες μεταλλαγές¹⁷. Πρόκειται για το γονίδιο CACNA1A το οποίο κωδικοποιεί την α1 υπομονάδα των διαύλων Ca^{++} . Οι μισές περίπου οικογένειες με οικογενή ημιπληγική ημικρανία, έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο CACNA1A, γι' αυτό και σήμερα πιστεύεται ότι τουλάχιστον ένα ακόμα γονίδιο είναι υπεύθυνο για αυτή την σπάνια μορφή ημικρανίας¹⁷.

1.5 Μεταβολικά νοσήματα

Τα μεταβολικά νοσήματα που συνδέονται με ισχαιμικά ΑΕΕ (ιδιαίτερα σε παιδιά και νέους) είναι κυρίως τρία: α) η νόσος Fabry, β) το σύνδρομο MELAS, το οποίο αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικότερα παραδείγματα των μιτοχονδριακών εγκεφαλομυοπαθειών και γ) η ομοκυστεϊνουρία, η οποία έχει περιγραφεί παραπάνω.

α) Νόσος Fabry

Η νόσος Fabry είναι φυλοσύνδετο υπολειπόμενο νόσημα, το οποίο οφείλεται σε μεταλλαγές στο γονίδιο του λυσοσωμιακού ενζύμου α-γαλακτοσιδάση Α, που βρίσκεται στην χρωμοσωμιακή θέση Xq22.

Η νόσος οδηγεί στην εναπόθεση του κεραμιδο-τρι-εξοσιδίου στην έσω και στη μέση στιβάδα των αγγείων προκαλώντας προοδευτική στένωση του αυλού τους με αποτέλεσμα την εμφάνιση ισχαιμικών επιπλοκών από τα στεφανιαία αγγεία και τα μικρά αγγεία του εγκεφάλου. Η νόσος χαρακτηρίζεται κλινικά από παραισθήσεις στα άκρα, πρωτεϊνουρία και εμφάνιση καρδιακού εμφράγματος και ΑΕΕ σε ηλικία άνω των 30 χρονών. Για άγνωστο λόγο τα ΑΕΕ είναι συχνότερα αποτέλεσμα απόφραξης των κλάδων του σπονδυλοβασικού συστήματος.

Αν και οι ασθενείς με τη νόσο μπορεί να εμφανίσουν όλα τα είδη των ΑΕΕ, δηλαδή ενδοεγκεφαλική αιμορραγία, υπαραχνοειδή αιμορραγία και ισχαιμία, εν τούτοις το συχνότερο είδος είναι το ισχαιμικό ΑΕΕ των μικρών και των μεγάλων αγγείων¹⁸.

1.5.2 Σύνδρομο MELAS (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes)

Οι μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες είναι ετερογενής ομάδα νοσημάτων που οφείλονται στη διαταραχή του μεταβολισμού της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Η αναπνευστική αλυσίδα είναι επιφορτισμένη με την παραγωγή της ενεργειακής ομάδας ATP, γι' αυτό και η διαταραχή της εκδηλώνεται κλινικά σε ιστούς που έχουν σημαντικές ενεργειακές ανάγκες, όπως είναι ο εγκέφαλος και ο μυϊκός ιστός.

Σήμερα έχουν αναγνωριστεί δεκάδες σύνδρομα που οφείλονται σε διαταραχή του μεταβολισμού της αναπνευστικής αλυσίδας και τα οποία χαρακτηρίζονται από μητρική κληρονομικότητα (είδος κληρονομικότητας που δεν ακολουθεί τους νόμους του Mendel). Η πλειοψηφία των μιτοχονδριακών εγκεφαλομυοπαθειών προκαλούνται από γενετική βλάβη του μιτοχονδριακού DNA.

Ένα από τα πλέον χαρακτηριστικά σύνδρομα είναι το σύνδρομο MELAS, το οποίο χαρακτηρίζεται από εγκεφαλοπάθεια, γαλακτική οξέωση και επεισόδια που προσομοιάζουν σε ΑΕΕ. Επιπλέον χαρακτηριστικό εύρημα στο σύνδρομο είναι και η παρουσία παθολογικών μιτοχονδριακών συσσωρεύσεων (ragged red fibers) στο μυϊκό ιστό, ορατών στο μικροσκόπιο. Τα ΑΕΕ είναι ισχαιμικού τύπου και ορίζονται σαν βλάβες που μοιάζουν με ΑΕΕ (stroke-like), διότι η ισχαιμική περιοχή δεν ακολουθεί συγκεκριμένη κατανομή αρτηρίας στο ΚΝΣ. Το γιατί συμβαίνει αυτό δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα.



Η συχνότερη γενετική βλάβη (80%) είναι η σημειακή μετάλλαξη A3243G στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Leu}(^{UUR}). Άλλες σημειακές μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί και προκαλούν το σύνδρομο MELAS είναι η A3251G και η T3271C, στο ίδιο γονίδιο. Όλες οι σημειακές μεταλλάξεις είναι ανιχνεύσιμες και στο αίμα, γεγονός που καθιστά εύκολη τη διάγνωση σε μοριακό επίπεδο^{19,20}.

Μελέτες συσχέτισης

Οι μελέτες συσχέτισης, όπως έχει αναφερθεί, στηρίζονται στην μελέτη της συχνότητας γενετικών πολυμορφισμών σε ασθενείς με ΑΕΕ σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό ή σε μάρτυρες με ίδια χαρακτηριστικά (φύλο, ηλικία, παράγοντες κινδύνου) (case-control studies).

Έχουν δύο βασικά μειονεκτήματα, σε σχέση με τις μελέτες αναζήτησης του παθογόνου γονιδίου:

- i. πολλές φορές τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα στους διάφορους πληθυσμούς γεγονός που ενδεχομένως αντανάκλα το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των διάφορων υπό μελέτη πληθυσμών και
- ii. η πιθανή συσχέτιση που ανιχνεύεται να μην έχει άμεση σχέση (τροποποιητική ή παθογόνος) με τα ΑΕΕ, αλλά απλά να βρίσκεται πολύ κοντά στο άγνωστο παθογόνο γονίδιο σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium).

Παρόλα τα μειονεκτήματα, οι μελέτες συσχέτισης σήμερα αποτελούν σημαντικό εργαλείο για τους μοριακούς γενετιστές στην προσπάθεια τους να εντοπίσουν την γενετική βάση διαφόρων νοσημάτων και ειδικότερα αυτών που θεωρούνται πολυπαραγοντικά όπως είναι και η πλειοψηφία των ΑΕΕ. Επαναλαμβανόμενες θετικές συσχετίσεις ενός γενετικού πολυμορφισμού σε ένα γονίδιο με ένα νόσημα, σε διάφορους πληθυσμούς, αποτελεί ισχυρή ένδειξη εμπλοκής του ίδιου ή παραπλήσιου γονιδίου στην αιτιοπαθογένεια της νόσου²¹.

Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί εκτενώς γενετικοί πολυμορφισμοί σε διάφορα γονίδια, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν σε μεταβολικές οδούς που εμπλέκονται στην παθογένεια των ισχαιμικών ΑΕΕ. Οι πολυμορφισμοί αυτοί θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε πέντε κατηγορίες⁷, ανάλογα με την μεταβολική οδό στην οποία εμπλέκονται τα γονιδιακά προϊόντα:

- 1) αιμόσταση,
- 2) σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης,
- 3) παραγωγή νιτρικού οξέος,
- 4) μεταβολισμός ομοκυστεΐνης και
- 5) μεταβολισμός λιπιδίων.

Στο πίνακα 2 αναφέρονται οι μεγαλύτερες (σε αριθμό ασθενών) μελέτες με θετικά και αρνητικά αποτελέσματα για κάθε κατηγορία⁷.

Πίνακας 2. Γενετικοί πολυμορφισμοί σε μελέτες συσχέτισης με ΑΕΕ

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
Ινωδογόνο	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-αγγιοτενσίνης</i>					
ACE	I/D	case-control	510	1998	Θετικό
ACE	I/D	case-control	488	1995	Αρνητικό
<i>Παραγωγή νιτρικού οξέος</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			

* Τροποποιημένο από Hassan and Markus⁷

Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΑΟΞΟΝΑΣΗΣ

Η οικογένεια των γονιδίων της παραοξονάσης (PON) έχει τρία γνωστά μέλη, παραοξονάση 1 (PON1), παραοξονάση 2 (PON2) και παραοξονάση 3 (PON3) που έχουν χαρτογραφηθεί στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 7 μεταξύ των θέσεων q21.3 και q22.1, στον άνθρωπο, και κωδικοποιούν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες²². Τα γονίδια παρουσιάζουν σημαντική δομική ομοιότητα, όπως για παράδειγμα τόσο το γονίδιο της PON1 όσο και το γονίδιο της PON2 έχουν 8 ιντρόνια και οι περιοχές σύνδεσης εξονίων / ιντρονίων συμβαίνουν σε αντίστοιχες θέσεις, ενώ τα γονίδια τους είναι μεγέθους 27 και 28kb αντίστοιχα²³ και φαίνεται ότι έχουν προκύψει από γονιδιακό διπλασιασμό ενός κοινού εξελικτικού πρόγονου (precursor)²².

Τα τρία γονίδια της παραοξονάσης είναι τοποθετημένα με απόσταση 500kb μεταξύ τους στην εξής σειρά:

κεντρομερές-PON1-PON3-PON2-τελομερές

Ανάμεσα στα διάφορα είδη θηλαστικών, η PON1, η PON2 και η PON3 παρουσιάζουν 79-90% ομοιότητα σε επίπεδο των αμινοξέων και 81-91% ομοιότητα σε επίπεδο DNA²². Το γονίδιο της PON1 χαρακτηρίζεται από την παρουσία 3 επιπρόσθετων νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 4, που κωδικοποιούν το αμινοξύ λυσίνη στη θέση -105, και τα οποία απουσιάζουν από τα cDNAs των PON2 και PON3²³. Η PON1 είναι γνωστό από πολλά χρόνια ότι έχει την ικανότητα να υδρολύει τα ξενοβιοτικά στον ανθρώπινο ορό και έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες να ταυτοποιηθούν τα φυσιολογικά της υποστρώματα και να διερευνηθεί η σχέση της με την αθηροσκλήρυνση. Ο ρόλος των PON2 και PON3 είναι λιγότερο κατανοητός από ότι της PON1²².

Το 1953 ο Aldridge και οι συνεργάτες του^{24,26,27} επινόησαν μία μέθοδο ταξινόμησης των εστερασών βασισμένη στην αλληλεπίδραση τους με οργανοφωσφορικές ενώσεις. Οι Α-εστεράσες υδρολύουν τις οργανοφωσφορικές ενώσεις, ενώ οι Β-εστεράσες αναστέλλονται από αυτές. Οι Α-εστεράσες περιλαμβάνουν τις arylalkylphosphatases (παραοξονάση) και τις diiso-propylfluoro-

phosphatases (DFP'ases). Οι Β-εστεράσες περιλαμβάνουν τις καρβοξυλεστεράσες και τις χολινεστεράσες. Η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης από τις οργανοφωσφορικές ενώσεις (οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως ως εντομοκτόνα και αέρια νεύρων) αποτελεί την τοξική βιοχημική βλάβη των ουσιών αυτών. Οι Α-εστεράσες μπορούν να υδρολύουν τις οργανοφωσφορικές ενώσεις σε σχετικώς ακίνδυνες ουσίες για τον ανθρώπινο οργανισμό και έτσι είναι προστατευτικές έναντι των βλαβερών τους επιδράσεων. Οι Α-εστεράσες, ως ομάδα, υδρολύουν τις οργανοφωσφορικές ενώσεις, τα καρβαμίδια και τους αρωματικούς καρβοξυλικούς εστέρες.

Η παραοξονάση (aryldialkylphosphatase, EC.3.1.8.1.), που ονομάζεται έτσι επειδή το παραοξόν είναι το υπόστρωμα που κοινώς χρησιμοποιείται για να μετρηθεί η ενζυμική της δραστηριότητα, είναι μία Α-εστεράση που απαιτεί ιόντα Ca^{++} τόσο για την δραστηριότητα όσο και για την σταθερότητα της. Αυτό την ξεχωρίζει από τις άλλες Α-εστεράσες όπως είναι οι DFP'ases που απαιτούν Co^{++} Mn^{++} ή Mg^{++} για την δραστηριότητα τους. Οι παραοξονάσες υπάρχουν σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς όπως είναι το ήπαρ, οι νεφροί, το λεπτό έντερο και το πλάσμα²⁴.

Παραοξονάση 1 (PON1)

Ο ρόλος της PON1 του ορού στην τοξικότητα από οργανοφωσφορικά είναι: τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, για παράδειγμα το παραθείο, χρησιμοποιούνται στην γεωργία ως τα μη τοξικά παράγωγα του θείου. Ενεργοποιούνται in vivo από τις κυτόχρωμα-P450-εξαρτώμενες μικροσωματικές μονο-οξυγονάσες στα πολύ τοξικά τους οξυγονούχα (οxon) παράγωγα τους μέσω της διεργασίας που είναι γνωστή ως οξειδωτική αποσουλφίδωση. Αυτή η διεργασία πιστεύεται ότι συμβαίνει κατά κύριο λόγο στο ήπαρ όπου όμως υπάρχουν διάφορα ένζυμα, όπως οι μονο-οξυγονάσες και οι παραοξονάσες, ικανά να αδρανοποιήσουν τα τοξικά παράγωγα. Έτσι η ισορροπία του ηπατικού μεταβολισμού των οργανοφωσφορικών ενώσεων τείνει προς την πλευρά της αποτοξίνωσης^{24,25}.

Στα θηλαστικά, οποιοδήποτε οξόν (οxon) που αποφεύγει την ηπατική αδρανοποίηση μπορεί να υδρολυθεί από την παραοξονάση του ορού προτού φτάσει στον εγκέφαλο, όπου είναι η περιοχή δράσης των οργανοφωσφορικών ενώσεων. Με μερικές οργανοφωσφορικές ενώσεις, η υδρόλυση από την παραοξονάση του ορού

είναι τόσο γρήγορη έτσι ώστε έχει εκτιμηθεί ότι καμία ενεργή οργανοφωσφορική ένωση δεν φτάνει ουσιαστικά στον εγκέφαλο^{24,25}.

Η καθαρή παραοξονάση του ανθρώπινου ορού (PON1) έχει μοριακό βάρος 43 kDa, περιέχει 354 αμινοξέα και εκκρίνεται από το ήπαρ²². Στον ορό είναι σχεδόν αποκλειστικά τοποθετημένη στην επιφάνεια των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) και πιο συγκεκριμένα σε ένα τμήμα των HDL που περιέχει την apoA-I και την apoJ. Έχει διατηρηθεί σε μεγάλο βαθμό στα θηλαστικά αλλά είναι απύσα σε άλλους οργανισμούς όπως τα ψάρια και τα πουλιά²⁸.

Υπάρχουν δύο ισομορφές της PON1 και φαίνεται ότι αποτελούν δύο οξειδωτικές καταστάσεις της παραοξονάσης, μιας με όλα τα κατάλοιπα κυστεΐνης ελεύθερα και μία με έναν απλό δισουλφιδικό δεσμό. Αυτές οι δομικές ισομορφές δεν μπορούν να εξηγηθούν από σημειακές μεταλλάξεις που καθορίζουν τις γενετικές ισομορφές, και από άλλες μελέτες έχει προκύψει ότι η καθαρή ενεργή PON1 περιέχει έναν απλό ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ της Cys-41 και Cys-352, με ένα ελεύθερο κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση -283.

Το cDNA για την PON1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 354 αμινοξέων. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας cDNA κλώνων της παραοξονάσης από άνθρωπο και κουνέλι έδειξε ότι οι ώριμες πρωτεΐνες διατηρούν τις υδρόφοβες σηματοδοτικές αλληλουχίες τους και μόνο το αμινοτελικό κατάλοιπο της μεθειονίνης απομακρύνεται²⁴. Η δραστηριότητα της PON1 αναστέλλεται από σουλφυδρυλικούς παράγοντες και αυτή η αναστολή αντιστρέφεται από την κυστεΐνη. Έτσι ένα κατάλοιπο κυστεΐνης θα μπορούσε να είναι ένα σημαντικό συστατικό του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Παρόλα αυτά, οι Sorenson και οι συνεργάτες του²⁹ μελέτησαν αυτήν την υπόθεση και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η κυστεΐνη-283 δεν είναι απαραίτητη για την υδρόλυση του παραοξόν.

Μέχρι τώρα, η δομή του ενεργού κέντρου της PON1 δεν έχει ακόμη καθοριστεί. Δεν είναι γνωστό το αν η PON1 περιέχει μία καταλυτική τριάδα αμινοξέων που είναι όμοια με εκείνη που υπάρχει σε άλλες υδρολάσες²⁴. Λεπτομερείς μελέτες της κινητικής της υδρόλυσης του παραοξόν από την καθαρή ανθρώπινη παραοξονάση σε pH 10.5 έδειξαν ότι το παραοξόν υδρολύεται σε δύο βήματα, δηλαδή μετά την πρόσδεση του παραοξόν πρώτα απελευθερώνεται η *p*-νιτροφαινόλη και μετά το φωσφορικό διαιθύλιο.

Τα ιόντα ασβεστίου παίζουν δύο ρόλους σε αυτόν τον καταλυτικό μηχανισμό. Πρώτον, τα ιόντα Ca⁺⁺ είναι απαραίτητα για την διατήρηση του ενεργού κέντρου, είτε

με το να συμμετέχουν άμεσα στην καταλυτική αντίδραση, είτε με το να διατηρούν τη σωστή διαμόρφωση του ενεργού κέντρου.

Δεύτερον, τα ιόντα Ca^{++} διευκολύνουν την απομάκρυνση του φωσφορικού διαιθυλίου από το ενεργό κέντρο του ενζύμου, πιθανώς με την πόλωση του P-O διπλού δεσμού του παραοξόν, καθιστώντας τον φώσφορο ευαίσθητο σε πυρηνόφιλη υποκατάσταση²⁴.

Η δραστικότητα της παραοξονάσης είναι παρούσα σε νεογέννητα και πρόωρα νεογνά στο μισό περίπου του επιπέδου που ανευρίσκεται στους ενήλικες. Τα επίπεδα των ενηλίκων προσεγγίζονται περίπου ένα χρόνο μετά από την γέννηση και φαίνεται ότι παραμένουν σταθερά σε όλη τη ζωή. Καμία διαφορά δεν έχει αναφερθεί στην δραστικότητα της PON1 μεταξύ των δύο φύλων, παρόλο που η PON1 σχετίζεται με τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL) και υπάρχει εμφανής διαφορά στην ολική συγκέντρωση της κυκλοφορούσας HDL μεταξύ ανδρών και γυναικών²⁴.

Είναι γνωστό ότι οι HDL επιδρούν αρνητικά και οι LDL (λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας) θετικά στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης. Οι HDL έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν λιπιδικά υπεροξειδία και έτσι μπορούν να μειώσουν την συσσώρευση τους στις LDL κάτω από οξειδωτικές συνθήκες. Οι HDL σε αντίθεση με τις LDL είναι ισότιμα κατανεμημένες σε όλο τον ορό όπου βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση από ότι οι LDL. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα υπάρχουν μόνο HDL λιποπρωτεΐνες²⁸. Η PON1 είναι ένα από τα ένζυμα που είναι προσδεδεμένα στις HDL και ευθύνονται για αυτή την ευεργετική δράση των HDL.

Η PON1 μπορεί να επιταχύνει τόσο την διάσπαση των φωσφολιπιδικών υδροξυπεροξειδίων (πριν την συσσώρευση τους στις LDL) όσο και της ακετυλοϋδρολάσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Η προστασία των HDL από την PON1 ενάντια στην οξείδωση τους, διατηρεί την ικανότητα τους για την αναστροφή μεταφορά της χοληστερόλης. Αυτό μειώνει τη συσσώρευση της χοληστερόλης στα μακροφάγα και έτσι επιβραδύνεται η έναρξη της αθηρωμάτωσης^{30,31}. Επιπρόσθετα, μπορεί να αποτρέψει την έναρξη φλεγμονωδών αντιδράσεων των κυττάρων στα αρτηριακά τοιχώματα καταστρέφοντας τα βιολογικώς ενεργά λιπίδια στις ήπια οξειδωμένες LDL. Ανοσολογικές τεχνικές έχουν δείξει ότι η PON1 συσσωρεύεται στα αρτηριακά τοιχώματα, στον άνθρωπο, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της αθηρωμάτωσης. Με αυτόν τον τρόπο, η HDL-σχετιζόμενη PON1 εστεράση συνεισφέρει στον προστατευτικό ρόλο της PON1 ενάντια στην αθηρωμάτωση, εμποδίζοντας τη συσσώματωση των προϊόντων της

οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών³². Μπορεί να υδρολύει τα λιπιδικά υπεροξειδία όχι μόνο στις LDL αλλά επίσης και στις αθηρωματικές βλάβες των στεφανιαίων αγγείων καθώς και των καρωτίδων λειτουργώντας ουσιαστικά σαν σημαντικός αντι-αθηρωματογενετικός παράγοντας³⁰.

Η υδρολυτική δραστικότητα της παραοξονάσης ενάντια στα οργανοφωσφορικά υποστρώματα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ασβέστιο. Αντίθετα, η δραστικότητα της σε σχέση με την παρεμπόδιση της συσσώρευσης των λιπιδικών υπεροξειδίων δεν απαιτεί την παρουσία ασβεστίου. Επιπρόσθετα, η κυστεϊνική ομάδα στη θέση 283 είναι σημαντική για την προστασία των LDL από οξείδωση αλλά όχι για την οργανοφωσφορική υδρόλυση. Αυτό δείχνει ότι είτε μπορούν να συμβούν αναδιαμορφώσεις του ενεργού κέντρου της PON1 (που προκαλούν απώλεια της υδρολυτικής δραστικότητας) κατά την διάρκεια της διατήρησης αντιοξειδωτικής δραστικότητας της, είτε μπορεί να περιέχει 2 ενεργά κέντρα : το αντιοξειδωτικό κέντρο, που εξαρτάται από την κυστεϊνή -283 και ένα δεύτερο κέντρο που ευθύνεται για την υδρόλυση των οργανοφωσφορικών και εξαρτάται από το ασβέστιο²⁸.

Παραοξονάση 2 (PON2)

Το γονίδιο της παραοξονάσης 2 (PON2) είναι το δεύτερο μέλος της οικογένειας των γονιδίων της παραοξονάσης. Η υψηλή ομοιότητα που υπάρχει στην αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ των PON πρωτεϊνών υποδηλώνει ίσως, ότι η PON2 έχει παρόμοια βιοχημική λειτουργία με αυτή της PON1 και της PON3.

Το 1998 οι Mochizuki και οι συνεργάτες του³³ στην προσπάθεια τους για μεταγραφική χαρτογράφηση του 7q21.3-q22.1 ανακάλυψαν το γονίδιο της παραοξονάσης 2. Έδειξαν με φυσική χαρτογράφηση ότι η PON2 εμφανίζει υψηλή συγγένεια με τη PON1 και PON3 και ότι όλα τα γονίδια βρίσκονται σε διάστημα 500kb το ένα από το άλλο. Όσον αφορά τη δομή της, υπέθεσαν ότι η PON2 όπως και η PON1 περιέχει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο που κατευθύνει την πρωτεΐνη στην μεμβράνη, περιέχει έναν ανάλογο δισουλφιδικό δεσμό που συνδέει τα κατάλοιπα που βρίσκονται κοντά στο N- τελικό και C- τελικό άκρο αντίστοιχα, ενώ η σταθερότητα της και η καταλυτική της δραστικότητα επίσης εξαρτάται από το ασβέστιο³³.

Η PON2, παρόλο που εκφράζεται ευρέως σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς, όπως στον εγκέφαλο, στο ήπαρ, στους νεφρούς και στους όρχεις, δεν ανιχνεύεται με Western ανάλυση ούτε στις HDL, ούτε στις LDL. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο ότι η PON2 δεν υπάρχει στις HDL, είτε στο ότι η PON2 μπορεί να υπάρχει στις HDL αλλά δεν είναι ανιχνεύσιμη με την μέθοδο αυτή. Αυτή η διαφορετικότητα στην έκφραση της PON2 ενδεχομένως υποδηλώνει ότι παίζει έναν διακριτό ρόλο *in vivo*, διαφορετικό από αυτόν των PON1 και PON3.

Η PON2 έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Σε κυτταροκαλλιέργειες βρέθηκε ότι η αυξημένη έκφραση της PON2 μειώνει την ενδοκυττάρια οξειδωτική κατάσταση των κυττάρων μετά από χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Κύτταρα που επίσης υπερεκφράζουν την PON2, τροποποιούν οξειδωτικά τις LDL σε λιγότερο βαθμό σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, όπως μετρήθηκε με την συσσώρευση των LDL λιπιδικών υδροξυπεροξειδίων και με την ικανότητα των LDL να επάγουν την χημειοτακτική δραστηριότητα των μονοκυττάρων σε ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα (HAEC). Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η PON2 μπορεί να παίζει ένα αντι-αθηρωματογενετικό ρόλο, μειώνοντας την οξείδωση των LDL και /ή μειώνοντας την παραγωγή των ενδοκυττάρων υδροξυπεροξειδίων³⁴.

Παραοξονάση 3 (PON3)

Το τρίτο μέλος της οικογένειας των γονιδίων της παραοξονάσης είναι η PON3, η οποία είναι μία πρωτεΐνη 40kDa που συντίθεται κυρίως, στο ήπαρ και σχετίζεται με τις HDL στον ανθρώπινο ορό ενώ απουσιάζει από τις LDL²².

Περιέχει και αυτή τα τρία διατηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, που έχουν ταυτοποιηθεί στην PON1. Η PON3 είναι παρόμοια με την PON1 τόσο στη συσχέτιση της με τις HDL, όσο και στην παρεμπόδιση του σχηματισμού των ήπια οξειδωμένων LDL (mildly oxidized LDL) ή την απενεργοποίησή τους. Σε αντίθεση με την PON1, η PON3 δεν υδρολύει το συνθετικό υπόστρωμα παραοξόν, και η έκφραση της σε HepG2 κύτταρα δεν ρυθμίζεται από οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Οι PON1 και PON3 πρωτεΐνες περιέχουν αρκετές διατηρημένες ομόλογες περιοχές φωσφορυλίωσης και N-γλυκοσυλίωσης. Παρόλ' αυτά, δεν είναι γνωστό το εάν οι PON πρωτεΐνες τροποποιούνται σε αυτές τις περιοχές ή η τροποποίηση αυτών των περιοχών απαιτείται για την *in vivo* δραστηριότητα.

Τα προβλεπόμενα μεγέθη για τις ανθρώπινες πρωτεΐνες PON1 και PON3 είναι 38.6 και 39.6 αντίστοιχα. Εντούτοις, η HDL-σχετιζόμενη PON1 τρέχει ως μία ~48kDa πρωτεΐνη, ενώ η PON3 ως μία ~40kDa πρωτεΐνη. Αυτό υποδηλώνει ότι η PON1 μπορεί να υφίσταται σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση, σε σχέση με την PON3. Επίσης η ανθρώπινη PON3 περιέχει τα 3 διατηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης που έχουν ταυτοποιηθεί στην PON1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η Cys 283 και ο ενδομοριακός δισουλφιδικός δεσμός, που ενώνει τα άλλα 2 κατάλοιπα, που υπάρχουν στην PON1 μπορεί επίσης να παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη δομή όσο και στην *in vivo* δρατικότητα της PON3.

Από μελέτες τέλος βρέθηκε ότι το mRNA της PON3 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους νεφρούς κάτι που δείχνει ότι η PON3 μπορεί έχει διαφορετικό ρόλο από την PON1, στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών στους νεφρούς^{35,36,37}.

Πολυμορφισμοί στα γονίδια της παραοξονάσης (PON1, PON2, PON3)

Στο γονίδιο της PON1 έχουν βρεθεί οι παρακάτω πολυμορφισμοί:

- Ο πολυμορφισμός Gln192Arg (A→T) (μετατροπή του γλουταμινικού οξέος-Gln σε αργινίνη-Arg στη θέση του αμινοξέος 192)
- Ο πολυμορφισμός Leu55Met (A→G) (μετατροπή της λευκίνης-Leu σε μεθειονίνη-Met στη θέση του αμινοξέος 55)²²
- 5 επιπλέον πολυμορφισμοί στη 5'-ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου (στον εκκινητή) οι οποίοι είναι: -107/-108, -126, -160/-162, -824/-832 και -907/-909^{38,39}.

Στο γονίδιο της PON 2 έχουν βρεθεί οι παρακάτω πολυμορφισμοί:

- Ο πολυμορφισμός Ala148Gly (C→G) (μετατροπή της αλανίνης-Ala σε γλυκίνη-Gly στη θέση του αμινοξέος 148)
- Ο πολυμορφισμός Ser311Cys (C→G) (μετατροπή της σερίνης-Ser σε κυστεΐνη-Cys στη θέση του αμινοξέως 311)³³.

Στο γονίδιο της PON 3 δεν έχει βρεθεί ως σήμερα, κάποιος συγκεκριμένος πολυμορφισμός.

Η δραστικότητα της PON 1 και πολυμορφισμοί στα γονίδια της PON 1 και της PON 2 έχει βρεθεί τα τελευταία χρόνια, ότι σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιαγγειακών νοσημάτων ενώ πρόσφατες επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι κάποιοι από τους πιο πάνω πολυμορφισμούς σχετίζονται και με τον κίνδυνο εκδήλωσης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, όπως είναι η νόσος Alzheimer και η νόσος Parkinson.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών PON1-55 (Leu55Met), PON1-192 (Gln192Arg) και PON2-311 (Ser311Cys) με την εμφάνιση ΑΕΕ σε ασθενείς που κατοικούν στην Λάρισα.

Ασθενείς και μέθοδος

Μελετήθηκαν 47 ασθενείς (ηλικίας 69.5 ± 11.1 , Α/Γ = 31/16) με ισχαιμικό ΑΕΕ και 50 φυσιολογικοί μάρτυρες (ηλικία 70.2 ± 12.7 , Α/Γ = 30/20). Οι ασθενείς είχαν εισαχθεί διαδοχικά το 2002 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, ενώ οι φυσιολογικοί μάρτυρες ήταν επισκέπτες του νευρολογικού ιατρείου, όπου είχε αποδειχθεί ότι δεν έπασχαν από ΑΕΕ ή άλλη μείζονα νευρολογική πάθηση. Τα γενικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των μαρτύρων φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των μαρτύρων.

	N	Ηλικία (έτη \pm SD)	Φύλο (Α/Γ)	Υπέρταση (%)	ΣΔ (%)	Υπερχολστεμία (%)
Ισχαιμικό ΑΕΕ	47	69.5 \pm 11.1	31/16	35 (74.5)	22 (46.8)	19 (40.4)
Μάρτυρες	50	70.2 \pm 12.7	30/20	17 (34.0)	11 (22.0)	17 (34.0)

Το πειραματικό μέρος της μελέτης αυτής στόχευε διαδοχικά:

- α) στην απομόνωση DNA από τα εμπύρηνια κύτταρα ολικού αίματος,
- β) τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων περιοχών του DNA με τη μέθοδο της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (multiplex PCR),
- γ) την πέψη των τμημάτων του DNA που προήλθαν από την προηγούμενη αντίδραση με ειδικό περιοριστικό ένζυμο και
- δ) την αναγνώριση μετά την πέψη των τμημάτων του DNA και την αξιολόγηση των ευρημάτων.

Τεχνικές

➤ Απομόνωση γενομικού DNA

Η απομονώση του γενομικού DNA έγινε με μία κλασσική τεχνική, που ονομάζεται μέθοδος εξαλάτωσης από ολικό αίμα, ακολουθώντας τα παρακάτω στάδια:

- 1η μέρα
 1. Τοποθετούμε το αίμα σε σωληνάριο των 15 ml και αραιώνουμε ως 12 ml περίπου με ddH₂O (υπότονο δις απεσταγμένο νερό). Με τη διαδικασία αυτή λύνονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια και απομακρύνονται.
 2. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3000 rpm, στους 4⁰C (απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων).
 3. Αδειάζουμε (πετάμε) το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα. Τα κύτταρα αραιώνονται σε ddH₂O έως 12 ml περίπου και ανακινούμε σε vortex.
 4. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3000 rpm, στους 4⁰C.
 5. Αδειάζουμε (πετάμε) το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα. Προσθέτουμε διάλυμα lysis I (διάλυμα θραύσης των πυρήνων) (pH 7.4, NH₄Cl 155mM, KHCO₃ 10mM, EDTA 1mM) μέχρι τα 12 ml. *Σημείωση: Το lysis I λύνει τους πυρήνες των λευκών αιμοσφαιρίων.*
 6. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3000 rpm, στους 4⁰C.
 7. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 5 και 6 με lysis I.

8. Αδειάζουμε (πετάμε) το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα. Προσθέτουμε διάλυμα lysis II (διάλυμα θραύσης των πυρήνων) (pH 8.2, Tris 10mM, NaCl 400mM, d₁-Na EDTA 2mM) μέχρι τα 6 ml. *Σημείωση: Το lysis II σπάει τους πυρήνες και παίρνουμε DNA.* Ανακινούμε καλά και επωάζουμε για 15-30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθέτουμε 750λ SDS 10% και 100λ πρωτεΐνάση K (10mg/ml). *Σημείωση₁: Το SDS ανοίγει την πυρηνική μεμβράνη και η πρωτεΐνάση K προκαλεί πεπτιδική υδρόλυση – αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.* (Συχνά χρησιμοποιούμε πρωτεΐνάση K 23.2 mg/ml, οπότε προσθέτουμε περίπου 25λ). *Σημείωση₂: Σε περίπτωση που η ποσότητα του δείγματος αίματος που δουλεύουμε είναι αρκετή, προσθέτουμε μικρότερη ποσότητα πρωτεΐνάσης K (περίπου 60-70λ)*
10. Επώαση στους 37⁰C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight).

- 2η μέρα

1. Προσθέτουμε 2ml κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου νατρίου (6M NaCl) και αναδεύουμε ισχυρά για 15 δευτερόλεπτα (κατακρήμνιση των πρωτεϊνών).
2. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3500 rpm, στους 4⁰C.
3. Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάκι και πετάμε το ίζημα.
4. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3500 rpm, στους 4⁰C.
5. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάκι των 50 ml και πετάμε το ίζημα.
6. Ακολουθεί καταβύθιση (precipitation) του DNA με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης (2πλασιο όγκο σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και CH₃COONa σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του αρχικού διαλύματος. *Σημείωση: Σε περίπτωση που η ποσότητα του δείγματος του αίματος που δουλεύουμε, είναι αρκετή, δεν χρειάζεται να προσθέσουμε CH₃COONa.*
7. Επώαση στους -20⁰C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight).

- 3η μέρα
1. Φυγοκεντρούμε για 50 λεπτά στις 3500 rpm, στους 4⁰C (ή αν πιάνει η φυγόκεντρος πολλές στροφές για 30 λεπτά στις 8000 rpm).
 2. Ξεπλένουμε το ίζημα με 1 ml 70% αιθανόλης και φυγοκεντρούμε για 30 λεπτά στις 12000 rpm, στους 4⁰C.
 3. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 2 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρωσης είναι 20 λεπτά.
 4. Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο (αιθανόλη) προσεκτικά, (αφήνουμε μόνο το ίζημα – DNA) και καλύπτουμε το σωληνάριο με παραφίλι το οποίο τρυπάμε με μικροσκοπική καρφίτσα.
 5. Επώαση σε θερμοκρασία ψυγείου.

Η συγκέντρωση του DNA στο τελικό διάλυμα υπολογίστηκε μετά από φωτομέτρηση σε μήκη κύματος 260nm και 280nm με τη χρήση του τύπου:

Συγκέντρωση DNA= αραίωση x 50 x τιμή OD₂₆₀, με βάση το γεγονός ότι συγκέντρωση DNA ίση με 50mg/ml δίνει απορρόφηση ίση με τη μονάδα.

Η καθαρότητα του DNA αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό του λόγου OD₂₆₀/OD₂₈₀ ο οποίος κρίνεται ικανοποιητικός όταν κυμαίνεται μεταξύ 1,7 και 1,9.

Τιμές μικρότερες από 1,7 υποδηλώνουν πρόσμειξη πρωτεϊνών, ενώ τιμές μεγαλύτερες από 1,9 πρόσμειξη RNA.

Η ακεραιότητα και η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση του σε πηκτική αγαρόζης 2%.

➤ Αντίδραση PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι μια μέθοδος για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, εκμεταλλευόμενη ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου ενώ απαιτεί επίσης την παρουσία ενός

μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Το σημείο έναρξης της σύνθεσης μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτηρίου μορίου (εκκινητή, primer) που συνδέεται με την μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους, ο καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες, με βάση τα ακόλουθα βήματα:

1. αποδιάταξη (αποχωρισμός των δίκλωνων μορίων DNA και παραγωγή των μονόκλωνων αλυσιδών)
2. υβριδίωση (υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA)
3. προέκταση (σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA)

Ο χρόνος πρόεκτασης του τελικού κύκλου είναι συνήθως μεγαλύτερος έτσι ώστε να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση για την ολοκλήρωση της πρόεκτασης όλων των προϊόντων⁴⁰.

Όσον αφορά την πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (multiplex PCR), σε αυτή γίνεται χρήση διαφορετικών ζευγών εκκινητών για την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών διαφορετικών περιοχών της αλληλουχίας στόχου⁴⁰.

Η multiplex PCR ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τελικό όγκο 50μl που περιείχε:

1. DNA: 5μl
2. Ρυθμιστικό διάλυμα σε ποσότητα ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης (10x PCR Buffer){200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl}: 5μl
3. Ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 40 pM/μl) (κυτοσίνης, γουανίνης, αδενίνης και θυμίνης): 3μl από το καθένα
4. MgCl₂ (50mM): 7 μl
5. BSA(0.8 μg/μl): 4μl (αλβουμίνη βοός)
6. Εκκινητής PON1-55F: 1μl
7. Εκκινητής PON1-55R: 1μl
8. Εκκινητής PON1-192F: 1μl
9. Εκκινητής PON1-192R: 1μl
10. Εκκινητής PON2-311F: 1μl
11. Εκκινητής PON2-311R: 1μl

12. Ένζυμο: 1 unit Taq DNA polymerase (Invitrogen)

13. Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) μέχρι τελικού όγκου 50μl.

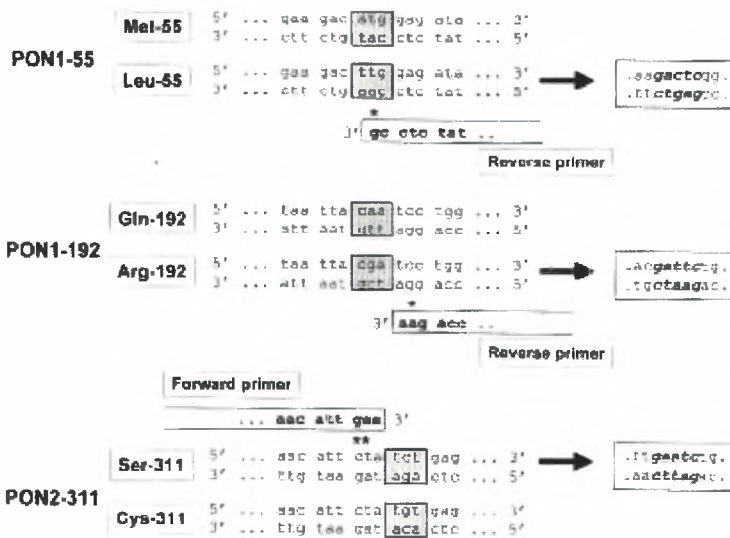
Οι εκκινητές⁴¹ (Genosys) που χρησιμοποιήθηκαν για την multiplex PCR ανάλυση φαίνονται στο πίνακα 4.

Πίνακας 4. Οι εκκινητές⁴¹ (Genosys) που χρησιμοποιήθηκαν.

Πολυμορφισμός	Forward εκκινητής (5'→3')	Reverse εκκινητής (3'→5')
PON1-55 (L→M)	GAGTGATGTATAGCCCCA GTTTC nt. 38-60 (intron 2)	AGTCCATTAGG CAGTATCTCCg nt. 194-173
PON1-192 (Q→R)	TTGAATGATATTGTTGCT GTGGGACCTGAG nt. 508- 537	CGACCACGCTAA ACCCAAATACAT CTCCCAGaA nt. 618-586
PON2-311 (S→C)	GGTTCTCCGCATCCAGAA CATTgaA nt. 923-947	TGTTAAGaTATCGCACTaTC ATGCC nt. 1118-1094

Ο μηχανισμός της δημιουργίας της περιοχής αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *HinfI* (Abgene), χρησιμοποιώντας εκκινητές που δεν υβριδοποιούνται σωστά (mismatched primers), φαίνεται στην εικόνα 2. Το νουκλεοτίδιο που βρίσκεται πριν από την 3'- βάση στον PON1-192 reverse εκκινητή δεν υβριδοποιείται σωστά και έτσι εισάγει ένα σημείο αποκοπής για το περιοριστικό ένζυμο *HinfI* (G/ANTC) στο DNA προϊόν ενίσχυσης παρουσία αργινίνης (CGA). Παρομοίως οι δύο βάσεις που βρίσκονται πριν από τις 3' -βάσεις στον PON2-311 forward εκκινητή έχουν τροποποιηθεί για να δημιουργήσουν μία περιοχή αποκοπής για το περιοριστικό ένζυμο *HinfI* στο DNA προϊόν ενίσχυσης παρουσία σερίνης (TCT)⁴¹.

Τέλος για τον PON1-55 πολυμορφισμό χρησιμοποιήθηκε ένας reverse εκκινητής με μία 3'-βάση που δεν υβριδοποιείται σωστά, δημιουργώντας έτσι μία περιοχή αποκοπής για το περιοριστικό ένζυμο *HinfI* παρουσία λευκίνης (TTG)⁴¹.



Εικόνα 2.

Το σχήμα δείχνει τον μηχανισμό της δημιουργίας της περιοχής αναγνώρισης του *HinfI* στο τελικό PCR προϊόν με την χρήση εκκινητών που δεν υβριδοποιούνται σωστά.

Για κάθε πολυμορφισμό, φαίνονται οι αλληλικές αλληλουχίες και τα πολυμορφικά κωδικόνια είναι πλαισιωμένα.

Φαίνεται επίσης η 3' περιοχή των forward ή των reverse εκκινητών ενώ οι αστερίσκοι αντιστοιχούν στις βάσεις που δεν υβριδοποιούνται σωστά.

Στα δεξιά, η περιοχή αναγνώρισης του *HinfI* (G/ANTC) που πήραμε στο PCR προϊόν, στην περίπτωση του ενός από τα δύο αλλήλια (Leu-55, Arg-192, Ser-311), φαίνεται με τα πλάγια γράμματα⁴¹.

Για τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένων τμημάτων του DNA χρησιμοποιήθηκε η πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών των προεπιλεγμένων τμημάτων του DNA έγινε σε ένα πρώτο στάδιο στους 94 °C για 5 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή (GeneAmp^R PCR System 9700). Κάθε κύκλος περιλάμβανε ένα στάδιο αποδιάταξης (1 λεπτό στους 94 °C), ένα στάδιο σύζευξης των εκκινητών με τη μητρική αλυσίδα (45 δευτερόλεπτα στους 61°C) και ένα στάδιο επέκτασης των εκκινητών (45 δευτερόλεπτα στους 72 °C). Μετά το τέλος των 40 κύκλων, ακολούθησε στάδιο επέκτασης 5 λεπτών στους 72 °C με στόχο τη σταθεροποίηση του προϊόντος της αντίδρασης.

Η ανάδειξη του τελικού προϊόντος της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 3% και οι "ταινίες" του DNA στην πηκτική αγαρόζης καταδείχθηκαν με εμβάπτιση βρωμιούχου αιθιδίου και έκθεση σε υπεριώδες φως.

Ωστόσο, η ανάδειξη του τελικού προϊόντος της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (multiplex PCR) δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα [ανάδειξη μόνο 2 "ταινιών" του DNA που αντιστοιχούσαν στους πολυμορφισμούς του γονιδίου της παραοξονάσης 1 (PON1 192 Q/R και PON1 55 L/M) αλλά όχι τρίτης "ταινίας" που αντιστοιχεί στον τρίτο πολυμορφισμό στο γονίδιο της παραοξονάσης 2 (PON2 311 S/C). Αυτό μας οδήγησε να καταφύγουμε στην εφαρμογή άλλης μεθόδου που περιελάμβανε τη εκτέλεση 2 ξεχωριστών PCR αναλύσεων :

A) μία για τους δύο πολυμορφισμούς PON1 L55M και Q192R

B) μία για τον πολυμορφισμό PON2 S311C

A) Η πρώτη PCR ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τελικό όγκο 50μl που περιείχε:

- DNA: 5μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα σε ποσότητα ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης (10x PCR Buffer) {200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl}: 5μl
- Ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 40 pM/μl) (κυτοσίνης, γουανίνης, αδενίνης και θυμίνης): 3μl από το καθένα
- MgCl₂ (50mM): 7 μl
- Εκκινητής PON1-55F: 1 μl

- Εκκινητής PON1-55R: 1 μ l
- Εκκινητής PON1-192F: 1 μ l
- Εκκινητής PON1-192R: 1 μ l
- Ένζυμο: 0.5 unit Taq DNA polymerase (Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) μέχρι τελικού όγκου 50 μ l.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη διπλή PCR φαίνονται στον Πίνακα 1 ενώ οι συνθήκες στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν:

- ❖ 94⁰ C για 5 λεπτά
- ❖ 94⁰ C για 1 λεπτό }
 ❖ 61⁰ C για 45 δευτερόλεπτα } 40 κύκλοι
- ❖ 72⁰ C για 45 δευτερόλεπτα }
 ❖ 72⁰ C για 5 λεπτά

Η ανάδειξη του τελικού προϊόντος της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% και οι "ταινίες" του DNA καταδείχθηκαν με εμβάπτιση βρωμιούχου αιθιδίου και έκθεση σε υπεριώδες φως.

Για την αναζήτηση των δύο πολυμορφισμών στα προϊόντα της διπλής PCR ανάλυσης έγινε πέψη με τη περιοριστική ενδονουκλεάση *HinfI* (Abgene). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- PCR προϊόν: 30 μ l
- Ένζυμο *HinfI*: 2.5 μ l
- Buffer 10x {10mM Tris-HCl(pH 7.5), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM DTT, 100 μ g/ml BSA}: 4 μ l
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) μέχρι τελικού όγκου 40 μ l.

Ακολούθησε επώαση στους 37⁰ C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight). Η ανάδειξη των προϊόντων της πέψης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3,5% και οι "ταινίες" του DNA καταδείχθηκαν με εμβάπτιση βρωμιούχου αιθιδίου και έκθεση σε υπεριώδες φως.

B) Η δεύτερη PCR ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τελικό όγκο 50μl

που περιείχε:

- DNA: 5μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα σε ποσότητα ίση με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης (10x PCR Buffer) {200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl}: 5μl
- Ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 40 pM/μl) (κυτοσίνης, γουανίνης, αδενίνης και θυμίνης): 3μl από το καθένα
- MgCl₂ (50mM): 7 μl
- Εκκινητής PON2-311F: 1 μl
- Εκκινητής PON2-311R: 1 μl
- Ένζυμο: 0.5 unit Taq DNA polymerase (Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) μέχρι τελικού όγκου 50μl.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη διπλή PCR φαίνονται στον Πίνακα 4, ενώ οι συνθήκες στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν:

- ❖ 94⁰ C για 5 λεπτά
- ❖ 94⁰ C για 1 λεπτό }
❖ 55⁰ C για 45 δευτερόλεπτα } 40 κύκλοι
- ❖ 72⁰ C για 45 δευτερόλεπτα }
❖ 72⁰ C για 5 λεπτά

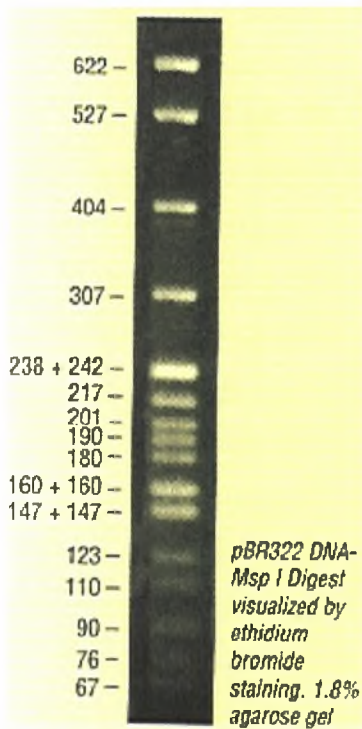
Η ανάδειξη του τελικού προϊόντος της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 3% και οι "ταινίες" του DNA καταδείχθηκαν με εμβάπτιση βρωμιούχου αιθιδίου και έκθεση σε υπεριώδες φως.

Για την αναζήτηση του πολυμορφισμού στο προϊόν της απλής PCR ανάλυσης έγινε πέψη με τη περιοριστική ενδονουκλεάση *HinfI* (Abgene). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- PCR προϊόν: 30μl
- Ένζυμο *HinfI*: 1μl

- Buffer 10x {10mM Tris-HCl(pH 7.5), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM DTT, 100μg/ml BSA): 4 μl
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) μέχρι τελικού όγκου 40μl.

Ακολούθησε επώαση στους 37⁰ C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight). Η ανάδειξη των προϊόντων της πέψης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 3,5% και οι "ταινίες" του DNA καταδείχθηκαν με εμβάπτιση βρωμιούχου αιθιδίου και έκθεση σε υπεριώδες φως.



Για την εκτίμηση του μεγέθους των λαμβανόμενων προϊόντων και από τις δύο PCR αναλύσεις γινόταν ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση DNA βακτηριοφάγων που είχε υποστεί κατάτμηση με ενδονουκλεάσες περιορισμού και απέδιδε τμήματα DNA με γνωστό μέγεθος. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν ο pBR 322 DNA-Msp I Digest (New England BioLabs).

Τα PCR-προϊόντα των 2 αντιδράσεων PCR που πραγματοποιήσαμε, για τους πολυμορφισμούς PON1-192, PON1-55 και PON2-311, περιμένουμε να έχουν μεγέθη 111, 144, 196bp αντίστοιχα⁴¹.

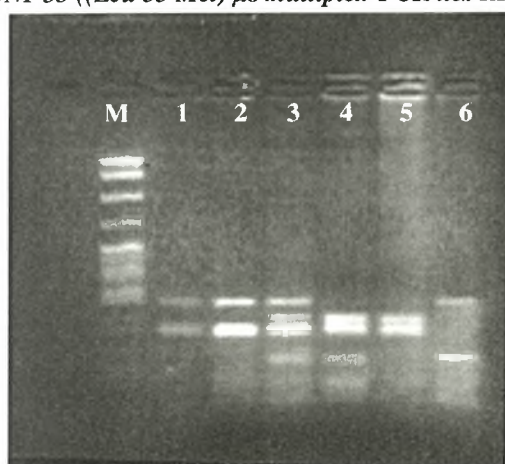
Μετά από την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HinfI* ,περιμένουμε:

- Η παρουσία του αλληλίου Arg πιστοποιείται από την διάσπαση της 111bp ταινίας (band) σε 2 μέρη (77 και 34 bp αντίστοιχα). Έτσι αν μετά την πέψη με το ένζυμο *HinfI* δεν υπάρξει διάσπαση, τότε έχουμε ομοζυγωτία ως προς το αλλήλιο Gln δηλαδή παρουσία δύο αλληλίων Gln ή γονότυπο Gln/Gln. Η παρουσία τριών μερών (111, 77 και 34 bp)⁴¹ υποδηλώνει παρουσία ετεροζυγωτίας δηλαδή παρουσία ενός αλληλίου Gln και ενός αλληλίου Arg και γονότυπο Gln/Arg ενώ η πλήρης διάσπαση του προϊόντος PCR σε δύο μέρη (77 και 34bp) υποδηλώνει ομοζυγωτία για το αλλήλιο Arg δηλαδή παρουσία 2 αλληλίων Arg και γονότυπο Arg/Arg.
- Η παρουσία του αλληλίου Leu πιστοποιείται από την διάσπαση της 144bp ταινίας (band) σε 2 μέρη (122 και 22 bp αντίστοιχα). Έτσι αν μετά την πέψη με το ένζυμο *HinfI* δεν υπάρξει διάσπαση, τότε έχουμε ομοζυγωτία ως προς το αλλήλιο Met δηλαδή παρουσία δύο αλληλίων Met ή γονότυπο Met/Met. Η παρουσία τριών μερών (144, 122 και 22 bp)⁴¹ υποδηλώνει παρουσία ετεροζυγωτίας δηλαδή παρουσία ενός αλληλίου Met και ενός αλληλίου Leu και γονότυπο Leu/Met ενώ η πλήρης διάσπαση του προϊόντος PCR σε δύο μέρη (122 και 22bp) υποδηλώνει ομοζυγωτία για το αλλήλιο Leu δηλαδή παρουσία 2 αλληλίων Leu και γονότυπο Leu/Leu .
- Η παρουσία του αλληλίου Ser πιστοποιείται από την διάσπαση της 196 bp ταινίας (band) σε 2 μέρη (173 και 23 bp αντίστοιχα). Έτσι αν μετά την πέψη με το ένζυμο *HinfI* δεν υπάρξει διάσπαση, τότε έχουμε ομοζυγωτία ως προς το αλλήλιο Cys δηλαδή παρουσία δύο αλληλίων Cys ή γονότυπο Cys/Cys. Η παρουσία τριών μερών (196, 173 και 23 bp)⁴¹ υποδηλώνει παρουσία ετεροζυγωτίας δηλαδή παρουσία ενός αλληλίου Cys και ενός αλληλίου Ser και γονότυπο Cys/Ser ενώ η πλήρης διάσπαση του προϊόντος PCR σε δύο μέρη (173 και 23bp) υποδηλώνει ομοζυγωτία για το αλλήλιο Ser δηλαδή παρουσία 2 αλληλίων Ser και γονότυπο Ser/Ser.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 5. Φαίνεται ότι οι γονότυποι PON1-55Leu/Leu και PON2-192Gln/Gln καθώς και τα αλληλία PON1-55Leu και PON2-192Gln έχουν αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς με ισχαιμικά ΑΕΕ αλλά η σημαντικότητα της αύξησης αυτής δεν μπορεί να τεκμηριωθεί επί του παρόντος, λόγω του μικρού δείγματος τόσο των ασθενών όσο και των μαρτύρων. Αυτός ήταν και ο λόγος που δεν αναζητήσαμε την στατιστική σημαντικότητα του ευρήματος επί του παρόντος, γιατί υπήρχε αυξημένος κίνδυνος λανθασμένου συμπεράσματος.

Ενδεικτικά αποτελέσματα της PCR/RFLP για τους πολυμορφισμούς PON1-192 (Gln 192 Arg) και PON1-55 ((Leu 55 Met) με multiplex-PCR και RFLP.



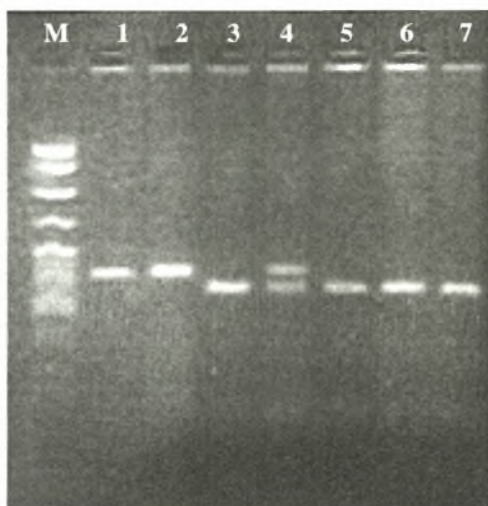
M= marker, 1= προϊόν PCR, 2-6 ασθενείς με ΑΕΕ.

Γονότυποι

2= PON1-55Met/Met και PON1-192Gln/Gln
3= PON1-55Leu/Met και PON1-192Gln/Arg
4= PON1-55Leu/Leu και PON1-55Gln/Arg
5= PON1-55Leu/Leu και PON1-192Gln/Gln
6= PON1-55Met/Met και PON1-192Arg/Arg

Το προϊόν PCR στα 144bp αντιστοιχεί στο PON1-55. Η διάσπασή του από το *HinfI* σε 122bp και 22bp υποδηλώνει την παρουσία Leu ενώ η απουσία διάσπασης υποδηλώνει παρουσία Met. Το προϊόν PCR στα 111bp αντιστοιχεί στο PON1-192. Η διάσπαση του από *HinfI* σε 77bp και 34bp υποδηλώνει παρουσία Arg ενώ η απουσία διάσπασης υποδηλώνει παρουσία Gln.

Ενδεικτικά αποτελέσματα της PCR/RFLP για τον πολυμορφισμό PON2-311 (Cys 311 Ser)



M= marker, 1= προϊόν PCR, 2-7 ασθενείς με ΑΕΕ.

Γονότυποι

2= PON2-311Cys/Cys
3= PON2-311Ser/Ser
4= PON2-311Cys/Ser
5-7= PON2-311Ser/Ser

Το προϊόν PCR στα 196bp αντιστοιχεί στο PON2-311. Η διάσπαση του από το *HinfI* σε 173bp και 23bp υποδηλώνει παρουσία Ser ενώ η απουσία διάσπασης υποδηλώνει παρουσία Cys.

Πίνακας 5. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα.

	Ασθενείς (n = 47)	Μάρτυρες (n = 50)
Πολυμορφισμός PON1-Leu55Met		
Γονότυπος		
Leu/Leu (%)	23 (48.9)	21 (42.0)
Leu/Met (%)	20 (42.6)	24 (48.0)
Met/Met (%)	4 (8.5)	5 (10.0)
Συχνότητα αλληλίων (Leu / Met)	70.2 / 29.8	66.0 / 34.0
Πολυμορφισμός PON1-Gln192Arg		
Γονότυπος		
Gln/Gln (%)	25 (53.2)	23 (46.0)
Gln/Arg (%)	17 (36.2)	18 (36.0)
Arg/Arg (%)	5 (10.6)	9 (18.0)
Συχνότητα αλληλίων (Gln / Arg)	71.2 / 28.8	64.0 / 36.0
Πολυμορφισμός PON2-Ser311Cys		
Γονότυπος		
Ser/Ser (%)	29 (61.7)	30 (60.0)
Ser/Cys (%)	15 (31.9)	16 (32.0)
Cys/Cys (%)	3 (6.3)	4 (8.0)
Συχνότητα αλληλίων (Ser / Cys)	77.7 / 22.3	76.0 / 34.0

Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη αξιολόγησε τη συσχέτιση των τριών πολυμορφισμών στα γονίδια της PON1 (Leu55Met και Gln192Arg) και PON2 (Ser311Cys) με τον κίνδυνο εκδήλωσης ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου.

Συσχέτιση πολυμορφισμών της παραοξονάσης με νευρολογικά νοσήματα

Η νόσος **Alzheimer** χαρακτηρίζεται από την προοδευτική εγκατάσταση ανοϊκής συνδρομής με τελική κατάληξη την πλήρη απώλεια των νοητικών λειτουργιών (μνήμη, αντίληψη, κλπ) του πάσχοντα. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι και γενετικοί παράγοντες κινδύνου, που σχετίζονται με την αθηρωμάτωση, ενέχονται στην παθογένεια των δύο πιο συχνά εμφανιζόμενων ανοϊκών συνδρόμων δηλαδή της νόσου Alzheimer και της αγγειακής άνοιας. Στους ήδη γνωστούς γενετικούς πολυμορφισμούς γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και σχετίζονται με τη νόσο Alzheimer, όπως το αλληλίο ε4 του γονίδιο της apoE και η μετάλλαξη στο κωδικόνιο 360 της apoA-IV, προσφάτως έχει προστεθεί και ο πολυμορφισμός Ser311Cys στο γονίδιο της παραοξονάσης 2. Ειδικότερα ο πολυμορφισμός Ser311Cys βρέθηκε να αλληλεπιδρά συνεργικά με το ε4 αλληλίο της apoE και να αυξάνει ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου⁴².

Η νόσος **Parkinson** ανήκει στα εκφυλιστικά νοσήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και χαρακτηρίζεται από την προοδευτική εγκατάσταση τρόμου ηρεμίας, βραδυκινήσιας, δυσκαμψίας και διαταραχών βάδισης. Οφείλεται στην εκφύλιση της μέλαινας ουσίας αλλά η αιτιολογία της, εκτός από λίγες οικογενείς μορφές όπου έχει εντοπιστεί το παθογόνο γονίδιο (α -synuclein, parkin και UCHL1) παραμένει στις μέρες μας αδιευκρίνιστη. Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι η νόσος είναι πολυπαραγοντική και εμπλέκονται λοιμώδεις, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες. Η παραοξονάση 1, όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή είναι μία αρυλεστεράση που υδρολύει οργανοφωσφορικά, όπως για παράδειγμα τα εντομοκτόνα, τα οποία αποτελούν γνωστούς παράγοντες κινδύνου για την παθογένεση της νόσου, καθώς και άλλες νευροτοξίνες. Σε μία πρόσφατη μελέτη συσχέτιστηκε ο πολυμορφισμός Leu55Met στο γονίδιο της παραοξονάσης 1 με τον κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου του Parkinson⁴³.

Συσχέτιση πολυμορφισμών της παραοξονάσης με καρδιοαγγειακές παθήσεις

Η παραοξονάση ανέκυψε ως ένας καινούριος παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση **καρδιοαγγειακών παθήσεων** την προηγούμενη δεκαετία, αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη πλήρως ο κίνδυνος που σχετίζεται με τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς στα γονίδια της παραοξονάσης 1 και 2.

Το PON1-192Arg αλληλίο και ο γονότυπος PON192Arg/Arg έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με την εκδήλωση καρδιοαγγειακών παθήσεων σε πολλές αλλά όχι σε όλες τις μελέτες. Σε μερικές μελέτες ο γονότυπος PON1-55Leu/Leu συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιοαγγειακής πάθησης, ακόμη και σε μελέτες όπου δεν υπήρχε συσχέτιση με τον γονότυπο PON1-192Arg/Arg. Σε μερικές εθνικές ομάδες τα αλληλία PON1-192Arg και PON1-55Leu εμφανίζουν ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης. Ο καρδιοπροστατευτικός ρόλος των HDL, η αναστολή ή η μείωση της οξείδωσης των LDL, φαίνεται ότι είναι σε μεγάλο βαθμό μία λειτουργία της PON1, που σχετίζεται με τις HDL. Η PON1 μεταβολίζει τα ήπια οξειδωμένα φωσφολιπίδια, γεγονός που πιο πιθανά οφείλεται στην καταστροφή των υδροϋπεροξειδικών παραγώγων των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Έτσι η συσχέτιση PON1 με καρδιοαγγειακά νοσήματα πιστεύεται ότι οφείλεται στον ρόλο της PON1 στον μεταβολισμό των βιοενεργών λιπιδικών μορίων και την προστασία έναντι της καταστροφής που προκαλείται από τις οξειδωμένες LDL.

Μία από τις πιο σημαντικές καρδιοαγγειακές παθήσεις είναι η **στεφανιαία νόσος**. Οι δύο κοινοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της παραοξονάσης 1 (Gln192Arg) και (Leu55Met), ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, επηρεάζουν τη δραστηριότητα της PON1 και έχουν καθοριστεί ως η μοριακή βάση αυτής της ποικιλομορφίας. Αρκετές μελέτες της συχνότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς, σε σχέση με μάρτυρες με ίδια χαρακτηριστικά (φύλο, ηλικία, παράγοντες κινδύνου) (case control studies), έχουν διερευνήσει την συσχέτιση μεταξύ των PON1 πολυμορφισμών και της στεφανιαίας νόσου αλλά τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Ενώ μερικές μελέτες έχουν δείξει μία αυξημένη προδιάθεση να αναπτύξουν στεφανιαία νόσο οι φορείς του PON1-192Arg αλληλίου, με τον σχετικό κίνδυνο να κυμαίνεται ανάμεσα 1.7 και 8.8, άλλες μελέτες δεν ανέδειξαν θετική συσχέτιση⁴⁴.

Σε 75 ασθενείς από την Ιαπωνία με στεφανιαία νόσο, που συγκρίθηκαν με 115 μάρτυρες, το PON1-192Arg αλληλίο φάνηκε ότι είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση αθηρωμάτωσης⁴⁵. Παρομοίως, μία μελέτη σε

200 Ασιάτες (Ινδούς) που έπασχαν από στεφανιαία νόσο αποκάλυψε ότι η συχνότητα του PON1-192Arg αλληλίου ήταν υψηλότερη στους πάσχοντες ασθενείς από ότι στους μάρτυρες⁴⁶. Από την σύγκριση δύο φυλετικών ομάδων Ινδών και Κινέζων από τη Σιγκαπούρη προέκυψε θετική συσχέτιση του PON1-192Arg αλληλίου στους Ινδούς αλλά όχι στους Κινέζους⁴⁷. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε ένα δείγμα 218 Κινέζων ασθενών που έπασχαν από στεφανιαία νόσο στην Ταϊβάν⁴⁸. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το PON1-192Arg αλληλίο μπορεί να είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση καρδιαγγειακής νόσου μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς³⁰.

Πολλές μελέτες απέτυχαν να δείξουν θετική συσχέτιση των PON1 πολυμορφισμών με τον κίνδυνο εκδήλωσης καρδιαγγειακής νόσου. Σε 380 Φιλανδούς ασθενείς δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση των εν λόγω πολυμορφισμών με καρδιαγγειακή νόσο όταν συγκρίθηκαν με 169 μάρτυρες⁴⁹ ενώ παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν σε 472 Ιταλούς ασθενείς⁵⁰, στους οποίους έγινε στεφανιαία αγγειογραφία και σε 440 Βρετανούς ασθενείς⁵¹. Τέλος σε μία μελέτη 408 Δυτικοευρωπαίων μη-ινσουλινοεξαρτώμενων διαβητικών, η ομοζυγωτία για το αλληλίο PON1-55Leu βρέθηκε ότι είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου⁵² για την εκδήλωση καρδιαγγειακής νόσου, κάτι όμως που δεν επιβεβαιώθηκε σε πληθυσμούς Κινέζων και Ινδών (Asians Indians)⁵³.

Οι Sanghera και οι συνεργάτες του⁵⁴ έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός στη θέση 192 του γονιδίου της PON 1 είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση καρδιαγγειακών παθήσεων σε Δυτικοευρωπαίους. Επίσης έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός S311C στο γονίδιο της PON2 συσχετίζεται με τον κίνδυνο εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου είτε από μόνος του είτε σε συνδυασμό με τον PON1-192 πολυμορφισμό στους Ινδούς.

Σε μία πρόσφατη μελέτη η Barbara Voetsch και οι συνεργάτες της⁴⁴ βρήκαν ότι ο PON1-192Arg/Arg γονότυπος ανεξάρτητα συσχετίζεται με μία αύξηση κατά τέσσερις φορές του κινδύνου εκδήλωσης μη θανατηφόρου αρτηριακού ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Το αποτέλεσμα τους αυτό είναι σε συμφωνία με πληθώρα case-control μελετών που έχουν δείξει μία αυξημένη ευαισθησία στην εκδήλωση στεφανιαίας νόσου μεταξύ των φορέων του PON1-192Arg αλληλίου.

Παρόλο που άλλες μελέτες δεν βρήκαν θετική συσχέτιση, μία πρόσφατη μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τον Mackness και τους συνεργάτες του⁵⁵ έδειξε ότι τελικά το PON1-192Arg αλληλίο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο

καρδιαγγειακής νόσου. Αυτά τα στοιχεία συμφωνούν και με εργαστηριακές μελέτες που δείχνουν ότι οι HDL που περιέχουν την PON1-192Arg ισομορφή είναι λιγότερη δραστική στην προστασία των LDL από οξειδωτικές τροποποιήσεις⁵⁶. Επιπρόσθετα, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ομοζυγώτες για το PON1-192Gln αλληλίο έχουν καλύτερο προφίλ των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος τους από ότι φορείς του PON1-192Arg αλληλίου⁵⁰.

Σε μία μελέτη 197 ασθενών με οικογενή υπερχοληστεριναιμία φαίνεται ότι ο κοινός πολυμορφισμός στο γονίδιο της παραοξονάσης 2 σχετίζεται με κλινικές εκδηλώσεις καρδιαγγειακών παθήσεων. Ενώ οι φορείς του PON2-311Ser αλληλίου φαίνεται ότι βρίσκονται σε κίνδυνο, άτομα με τον γονότυπο PON2-311Cys/Cys εμφανίζουν αυξημένη προστασία έναντι καρδιαγγειακών επεισοδίων⁵⁷.

Τα στοιχεία από μία άλλη μελέτη έδειξαν ότι το αλληλίο PON1-192Arg σχετίζεται με μία αύξηση κατά 36% του κινδύνου για έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αυτή η συσχέτιση είναι ανεξάρτητη από τον PON1-55Leu πολυμορφισμό, ο οποίος και δεν σχετίζεται με τον κίνδυνο για την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου στη συγκεκριμένη μελέτη⁵⁸. Μία πιθανή εξήγηση για αυτή την αντιφατική συσχέτιση των πολυμορφισμών στο γονίδιο PON1 με τα AEE είναι ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν συνδέεται άμεσα με τον κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου αλλά είναι σε ανισορροπία σύνδεσης με μία λειτουργική μετάλλαξη σε άγνωστο γονίδιο που συνδέεται άμεσα με το κίνδυνο της νόσου και βρίσκεται κοντά στη γονιδιακή θέση του PON1. Ακόμη στην μελέτη των Salonen και των συνεργατών⁵⁹ του βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός PON1-55 σχετίζεται με τον κίνδυνο εκδήλωσης οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου στους άνδρες.

Συσχέτιση πολυμορφισμών της παραοξονάσης με AEE

Μέχρι σήμερα, ένας μικρός αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί, όσον αφορά τη διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών στα γονίδια της PON1 και PON2 σε σχέση με τα AEE, αλλά όπως και στην περίπτωση των καρδιαγγειακών παθήσεων, έχουν προκύψει αντιφατικά αποτελέσματα. Η πλειονότητα των μελετών αυτών επικεντρώθηκε στην μελέτη της παθολογίας των καρωτίδων, ενώ μόνο 4 μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί μεταξύ ασθενών με ισχαιμικό AEE⁴⁴.

Η Voetsch και οι συνεργάτες της βρήκαν ότι ο γονότυπος PON1 192RR ανεξάρτητα σχετίζεται με μία αύξηση κατά 4 φορές του κινδύνου για την εκδήλωση αρτηριακού ισχαιμικού ΑΕΕ σε έναν πληθυσμό ενηλίκων <45 ετών⁴⁴.

Επίσης ο Imai και οι συνεργάτες του, διερεύνησαν την πιθανή συσχέτιση των 3 πολυμορφισμών, στα γονίδια της PON1 και PON2, με τον κίνδυνο εκδήλωσης ισχαιμικού ΑΕΕ σε 235 Γιαπωνέζους ασθενείς και βρήκαν ότι το αλληλόμορφο R192 αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση ισχαιμικού ΑΕΕ στους Γιαπωνέζους. Αυτή ήταν και η πρώτη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τη σχέση μεταξύ του αλληλόμορφου R192 και ισχαιμικού ΑΕΕ σε ασιατικούς πληθυσμούς. Αντίθετα, δεν βρέθηκε συσχέτιση των άλλων δύο πολυμορφισμών με τον κίνδυνο εκδήλωσης ισχαιμικού ΑΕΕ μεταξύ των ηλικιωμένων Γιαπωνέζων ασθενών⁶⁰.

Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αυστριακό πληθυσμό (Austrian Stroke Prevention Study) βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου 55LL και της εκδήλωσης μικροαγγειοπάθειας της λευκής ουσίας του εγκεφάλου. Επιπρόσθετα, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού M/L 55 (αλλά όχι του Q/R 192) και του βαθμού στένωσης των καρωτίδων^{61,62}.

Στη δική μας μελέτη, η οποία αποτελεί και την πρώτη μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό, βρέθηκε ότι η συχνότητα των γονοτύπων PON1-55Leu/Leu και PON1-192Gln/Gln καθώς και των αλληλίων PON1-55Leu και PON1-192Gln εμφανίζεται να είναι αυξημένη στους ασθενείς με ΑΕΕ (Πιν. 5) σε αντίθεση με τον πολυμορφισμό PON2-311 όπου δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά. Δεν γνωρίζουμε επί του παρόντος αν αυτές οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές και αυτό λόγω του μικρού δείγματος των ασθενών και μαρτύρων που μελετήθηκαν. Για να γίνει εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων θα πρέπει να αυξηθεί το δείγμα τόσο των μαρτύρων όσο και των ασθενών. Αυτό θα μας επιτρέψει επίσης να κάνουμε πολυπαραγοντική ανάλυση των αποτελεσμάτων για να αποκλειστεί η επίδραση άλλων παραγόντων κινδύνου για ΑΕΕ (π.χ. η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, κλπ.) στα αποτελέσματά μας.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι, σε αυτή τη διπλωματική εργασία, κατορθώσαμε με τεχνικές μοριακής βιολογίας να ανιχνεύσουμε τρεις πολυμορφισμούς στα γονίδια PON1 και PON2 και για πρώτη φορά σε Έλληνες ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ καθώς και σε φυσιολογικούς μάρτυρες. Η εργασία αυτή

αποτελεί τμήμα μίας σε εξέλιξη μελέτης που αφορά την ανίχνευση γενετικών προδιαθεσικών παραγόντων για ισχαιμικά ΑΕΕ στο Θεσσαλικό πληθυσμό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ράπτης Σ.
Εσωτερική παθολογία, Τόμος 1^{ος}, Επιστημονικές εκδόσεις Γρηγ. Παρισσιανός.
1998. Κεφάλαιο 9.5: Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια. σελ. 279-297.
2. Λογοθέτης Ι και Μυλωνάς Ι.
Νευρολογία, University Studio Press 1996, Τρίτη έκδοση. Κεφάλαιο 25: Οι
αγγειακές παθήσεις του εγκεφάλου. σελ. 416
3. Καλφάκης Ν, Πανάς Μ, Βασιλόπουλος Δ:
Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια: 14 σημεία προσανατολισμού. Δεύτερη
έκδοση. Αθήνα 2002.
4. Rowland LP :
'Merritt's Neurology'. Chapter 35: Pathogenesis, classification and epidemio-
logy of cerebrovascular diseases. p217-229.
5. John Walton :
'Brain's Diseases of the nervous system' Oxford Medical Publications 1993
Tenth Edition Chapter 6: Disorders of the cerebral circulation. p.197
6. Ross R:
Atherosclerosis- An inflammatory disease. *NEJM* 1999; 340: 115-126.
7. Hassan A and Markus H:
Genetics and ischeamic stroke. *Brain* 2000; 123: 1784-1812.
8. Natowicz M, Kelley RI:
Mendelian etiologies of stroke. *Ann Neurol* 1987; 22: 175-192.
9. Mudd SH, Skovby F, Levy HL et al:
The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase
deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31.
10. Brown MS, Goldstein JL, Fredrickson DS. Familial type 3
hyperlipoproteinemia. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS,
Goldstein JL, Brown MS, editors. The metabolic basis of inherited disease. 5th
ed. New York: McGraw-Hill. 1983; 655-71.
11. Third JL, Montag J, Flynn M et al:
Primary and familial hypoalphalipoproteinaemia. *Metabolism* 1984; 33: 136-
146.

12. Παπαδημητρίου Α, Χατζηγεωργίου Γ :
Σημειώσεις Νευρογενετικής. Γενετική των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων. Λάρισα. σελ 51-57.
13. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T et al:
Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64–67.
14. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH and Bertina RM:
A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698–3703.
15. Pettee A, Wasserman BA, Adams NL et al:
Familial Sneddon's syndrome. *Neurology* 1994; 44: 399–405.
16. Joutel A, Corpechot C, Ducros et al:
Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996; 383: 707-710.
17. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergowe MN et al:
Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca⁺⁺ channel gene. *Cell* 1996; 87: 543-552.
18. Crutchfield KE, Patronas NJ, Dambrosia JM et al :
Quantitative analysis of cerebral vasculopathy in patients with Fabry disease. *Neurology* 1998; 50: 1746–9.
19. DiMauro S:
Lessons from mitochondrial DNA mutations. *Seminars Cell Dev Biol.* 2001; 12: 397- 405.
20. Hadjigeorgiou GM, Kim SH, Fischbeck KH 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.
21. Shastri BS:
SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002; 47: 561-566.
22. Mackness B, Durrington PN and Mackness MI:
The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 357-362.

23. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J and La Du BN:
The human serum paraoxonase/ arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33: 498-507.
24. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN et al:
Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 69-76.
25. Mackness MI, Mackness B and Durrington PN:
Human serum paraoxonase (REVIEW). *Gen. Pharmac.* 1998; 31: 329-336.
26. Aldridge WN:
Serum esterase I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing *p*-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination. *Biochem J* 1953; 53: 110-117.
27. Aldridge WN:
Serum esterase II. An enzyme hydrolysing diethyl *p*-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J* 1953; 53: 117-124.
28. Durrington PN, Mackness MI and Mackness B:
Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-480.
29. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo C-L et al:
Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/ arylesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7187-7191.
30. Aviram M:
Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Molecular Medicine Today* 1999; 5: 381-386.
31. Aviram M:
Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 1581- 1590.
32. Watson, A.D. et al:
Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 2882- 2891.

33. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T et al:
Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 1998; 213: 149-157.
34. Ng CJ, Wadleigh DJ, Hama S et al:
Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *JBC* 2001; 276: 44444- 44449.
35. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE et al:
Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *JBC* 2000; 275: 33435- 33442.
36. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva et al:
Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidised lipids. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 542- 547.
37. La Du BN:
Is paraoxonase-3 another HDL-associated protein protective against atherosclerosis? *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 467- 468.
38. Leviev I and James RW:
Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum activities and concentrations. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 516-521.
39. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB et al:
Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 77-84.
40. Μπονάγου Σ :
Σημειώσεις αναλυτικής βιοχημείας. Λάρισα.
41. Motti C, Dessi M, Gnasso A et al:
A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis* 2001; 158: 35-40.
42. Janka Z, Juhasz A, Rimanoczy A et al :
Codon 311 (Cys→Ser) polymorphism of paraoxonase -2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Molecular Psychiatry* 2002; 7: 110-112.

43. Carmine A, Buervenich S, Sydow O et al:
Further evidence for an association of the paraoxonase 1 (PON1) Met-55 allele with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002; 17: 764- 766.
44. Voetsch B, Benke K, Damasceno BP et al:
Paraoxonase 192 Gln→ Arg polymorphism: An independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. *Stroke* 2002; 33: 1459-1464.
45. Zama T et al:
A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 3565-3569.
46. Pati N and Pati U:
Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indians subjects. *Int. J. Cardiol.* 1998; 30: 165-168.
47. Sanghera DK, Saha N, Aston CE et al:
Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 1067-1073.
48. Ko YL et al:
The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1998; 141: 259-264.
49. Antikainen M et al:
The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest.* 1996; 98: 883-885.
50. Ombres D. et al:
The Gln-Arg 192 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18: 1611-1618.
51. Rice GI, Ossei-Gerning N, Stickland MH et al:
The paraoxonase Gln-Arg 192 polymorphism in subjects with ischemic heart disease. *Coron Artery Dis* 1997; 8: 677-682.

52. Garin MC et al:

Paraoxonase polymorphisms Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest.* 1997 ; 99 : 62-66.

53. Sanghera DK et al:

The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asians Indians and Chinese. *Atherosclerosis* 1998; 136: 217-223.

54. Sanghera DK, Aston CE, Saha N et al:

DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 36-44.

55. Mackness B, Davies GK, Turkie W et al:

Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1451-1457.

56. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN et al:

Effect of human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high-density lipoprotein against low- density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 1998; 423: 57-60.

57. Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ et al:

PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis* 2001; 154: 641-649.

58. Sen-Banerjee S, Siles X and Campos H :

Tobacco smoking modifies association between Gln→Arg 192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2120.

59. Salonen JT, Malin R, Tuomainen TP et al:

Polymorphism in high-density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *Br Med J* 1999; 319: 487-489.

60. Imai Y, Morita H, Kurihara H et al:

Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2000; 149: 435-442.

61. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K et al:

Paraoxonase PON1 polymorphism Leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke* 1998; 29:2043- 2048.


62. Schmidt H, Schmidt R, Fazekas F et al:

MRI cerebral white matter lesions and paraoxonase PON1 polymorphisms: three-year follow-up of the Austrian Stroke Prevention Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1811-1816.



ΛΗΞΗ	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
~~Τηλ. 74.760-61~~ ΛΑΡΙΣΑ
 2410-565077
 565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
 ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057248

