



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ
ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ
ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ**

**ΕΥΘΥΜΙΟΥ Γ. ΔΑΡΔΙΩΤΗ
ΙΑΤΡΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2007



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ
ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ
ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ**

**ΕΥΘΥΜΙΟΥ Γ. ΔΑΡΔΙΩΤΗ
ΙΑΤΡΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2007

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

(Νόμος 5343/32, άρθρο 202 παρ. 2)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α. ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ. (επιβλέπων)

Γ. ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.

Π. ΚΟΛΛΙΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α. ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.

Ν. ΣΤΑΘΑΚΗΣ, Καθηγητής Παθολογίας Π.Θ.

Δ. ΧΑΤΖΟΥΛΗΣ, Καθηγητής Οφθαλμολογίας Π.Θ.

Γ. ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.

Ι. ΣΚΟΥΛΑΡΙΓΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας Π.Θ.

Α. ΤΣΕΖΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας Π.Θ.

Η. ΖΙΝΤΖΑΡΑΣ, Επίκουρος Καθηγητής Βιομαθηματικών-Βιομετρίας Π.Θ.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους Ακαδημαϊκούς μου δασκάλους κ. Παπαδημητρίου Αλέξανδρο, Καθηγητή Νευρολογίας, κ. Χατζηγεωργίου Γεώργιο, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας και κ. Κόλλια Παναγούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας για τη βοήθειά τους στην εκπόνηση αυτής της μελέτης και για την αγάπη τους και την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλαν όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κ. Δαρδιώτη Μαρία, βιοχημικό, για την πολυποίκιλη βοήθειά της.

Τέλος, η διατριβή δε θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την ολόψυχη ηθική συμπαράσταση και κατανόηση της γυναίκας μου, Βασιλικής Γάλλου.

Στις τρεις γυναίκες της ζωής μου,
τη Βασούλα, τη Σταυρούλα και την Ελίνα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη (σελ. 3)

Abstract (σελ. 5)

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κλινικά στοιχεία των ενδοεγκεφαλικών αιμορραγιών

Εισαγωγή (σελ. 7)

Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά (σελ. 7)

Αιτίες ΕΑ (σελ. 8)

Παράγοντες κινδύνου (σελ. 12)

Κλινική εικόνα (σελ. 13)

Πρόγνωση και πορεία (σελ. 19)

Διάγνωση (σελ. 22)

Θεραπεία (σελ. 24)

Παθοφυσιολογία των εγκεφαλικών αιμορραγιών

Παθοφυσιολογία της βλάβης του αγγειακού τοιχώματος στην ΠΕΑ

Αμυλοειδωσική Αγγειοπάθεια του Εγκεφάλου (σελ. 28)

Υπερτασική αγγειοπάθεια του Εγκεφάλου (σελ. 32)

Εξέλιξη του αιματώματος (σελ. 34)

Πρωτοπαθής και δευτεροπαθής βλάβη του εγκεφαλικού παρεγχύματος (σελ. 35)

Γενετική των εγκεφαλικών αιμορραγιών

Οικογενείς μορφές (σελ. 39)

Σποραδικές μορφές-μελέτες συσχέτισης (σελ. 43)

A1-αντιχυμοθρυψίνη (ACT) (σελ. 50)

Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) (σελ. 61)

Ιντερλευκίνες 1α, 1β και 1Ra (IL-1α, IL-1β, IL- Ra)

IL-1α, IL-1β (σελ. 69)

IL- Ra (σελ. 82)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μελέτες συσχέτισης (σελ. 87)

Σκοπός της μελέτης (σελ. 87)

Ασθενείς και μέθοδος (σελ. 88)

Τεχνικές (σελ. 93)

Αποτελέσματα (σελ. 119)

Συζήτηση (σελ. 133)

Βιβλιογραφία (σελ. 144)

Περίληψη

Εισαγωγή και σκοπός: Στην παθογένεση της πρωτοπαθούς ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας (ΠΕΑ) εμπλέκονται τόσο γενετικοί όσο και επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου. Η Α1-αντιχυμοθρυψίνη (ACT), το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) και οι ιντερλευκίνες (IL) 1α, 1β και 1Ra έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην παθολογία του αγγειακού τοιχώματος και τους μηχανισμούς πήξης. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο TT γονότυπος του A/T πολυμορφισμού του πεπτιδίου συνθήματος της ACT και ο DD γονότυπος του I/D πολυμορφισμού του ACE αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΠΕΑ. Σκοπός της παρούσας προοπτικής μελέτης είναι η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των ACT A/T, ACE I/D, IL-1α (-899), IL-1β (-511) και IL-1Ra (VNTR) γενετικών πολυμορφισμών και Ελλήνων ασθενών με ΠΕΑ.

Μέθοδος: Η μελέτη διενεργήθηκε σε 178 ασθενείς με ΠΕΑ και 206 φυσιολογικούς μάρτυρες σε αντιστοιχία με τους ασθενείς ως προς την ηλικία και το φύλο. Κατά την καταγραφή των ασθενών μεταξύ των στοιχείων που συλλέχθηκαν αξιολογήθηκαν τα εξής: ηλικία, φύλο, επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου, εντόπιση και όγκος της αιμορραγίας, κλίμακα κώματος Γλασκώβης κατά την είσοδο του ασθενούς και 6μηνη έκβαση σύμφωνα με την τροποποιημένη κλίμακα του Rankin. Η ταυτοποίηση των γονοτύπων της ACT (-15 A/T), του ACE I/D, της IL-1α (-899), της IL-1β(-511C/T) και της IL-1ra (VNTR) έγιναν με γνωστές PCR/RFLP μεθόδους. Πιθανές συσχετίσεις εξετάστηκαν με τη χρήση του Fisher's exact test, του t-test και του χ^2 test και οι αναλογίες πιθανοτήτων με τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν με βάση την ανάλυση με λογιστική παλινδρόμηση.

Αποτελέσματα: Από τη μελέτη δεν προέκυψε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στις συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών μαρτύρων στους εξετασθέντες πολυμορφισμούς (για τον πολυμορφισμό της ACT [OR(95% C.I.)]=1.14(0.64-2.01), ACE=1.08(0.58-1.82), IL-1α(-899)=1.03(0.55-2.02), IL-1β(-511)=0.66(0.51-1.53), IL-1ra (VNTR)=1.27(0.62-2.54). Στη μελέτη μας όμως διαπιστώθηκε ότι ο γονότυπος TT της ACT σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης ΠΕΑ στους μη υπερτασικούς ασθενείς OR (95% C.I.)=2.57 (1.02-6.51) $p=0.05$.

Συμπεράσματα: Η μελέτη μας επιβεβαιώνει τα θετικά αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί στους μη υπερτασικούς ασθενείς με ΠΕΑ. Η απουσία υπέρτασης, που αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της ΠΕΑ, πιθανόν να καθιστά φανερή την επίδραση του ACT πολυμορφισμού στο αγγειακό δίκτυο του εγκεφάλου αυξάνοντας την ευαισθησία για αιμορραγία. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την επιβεβαίωση των παραπάνω συσχετίσεων και την εξακρίβωση των υποκείμενων παθογενετικών μηχανισμών.

Abstract

Background and Purpose:

There is accumulating evidence that genetic elements contribute to the pathogenesis of primary intracerebral hemorrhage (PICH). Alpha-1 antichymotrypsin (ACT), angiotensin converting enzyme (ACE) and interleukins (IL) 1a, 1b and 1Ra are implicated in vascular pathology and coagulation processes. TT genotype of the ACT A/T signal peptide polymorphism and DD genotype of ACE I/D polymorphism have been reported to confer susceptibility for PICH. We conducted a prospective study to test possible association between ACT A/T signal peptide, ACE I/D, IL-1a (-899), IL-1b (-511) and IL-1Ra (VNTR) polymorphisms and PICH in a Greek cohort.

Methods:

178 patients with PICH were prospectively recruited in the study. ACT A/T signal peptide, ACE I/D, IL-1a (-899), IL-1b (-511) and IL-1Ra (VNTR) genotypes were determined in patients and 206 healthy, age and sex matched control subjects collected from Neurology outpatient Clinic using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method. Initial neurological status of patients was assessed by means of the Glasgow Coma Score, while we defined patients' six-month outcome using the modified Rankin Scale. Epidemiological risk factors as well as location and volume of the hemorrhage were also recorded. Possible associations were examined using the t-test, the Fisher's exact test and the χ^2 test. Odds ratios with the corresponding 95% confidence intervals were calculated using logistic regression analysis.

Results: No statistically significant difference was found in allele and genotype frequencies of all polymorphisms between patients and normal controls. (ACT polymorphism [OR(95% C.I.)]=1.14(0.64-2.01), ACE=1.08(0.58-1.82), IL-1 α (-899)=1.03 (0.55-2.02), IL-1 β (-511)=0.66(0.51-1.53), IL-1ra (VNTR)=1.27(0.62-2.54). However, our study showed an association [OR (95%C.I.)=2.57 (1.02-6.51), p=0.05] between ACT TT genotype and normotensive PICH patients.

Conclusions:

Our data confirm the previously reported association between ACT A/T signal peptide polymorphism and normotensive PICH patients. In the non-hypertensive patients, although they represent a heterogenic group, it is possible, that the absence of hypertension unmask the relatively minor effects of ACT A/T signal peptide polymorphism on cerebral vasculature making it more susceptible to hemorrhage. However, further studies should be conducted to confirm and evaluate this association.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κλινικά στοιχεία των ενδοεγκεφαλικών αιμορραγιών

Εισαγωγή

Η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (ΕΑ) είναι μια οξεία και αυτόματη εξαγγείωση του αίματος μέσα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα η οποία μπορεί να επεκταθεί στις κοιλίες και σε σπάνιες περιπτώσεις στον υπαραχνοειδή χώρο. Η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία αντιστοιχεί σε ένα ποσοστό 10-30% των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων (ΑΕΕ) που εισάγονται στα νοσοκομεία. Το ποσοστό αυτό αναμένεται να διπλασιαστεί τα επόμενα 50 χρόνια κυρίως λόγω της αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης του πληθυσμού. Η εγκεφαλική αιμορραγία σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα, ανικανότητα και θνητότητα στους 6 μήνες της τάξης του 30-50%(1). Η μακροχρόνια έκβαση είναι πτωχή: μόλις το 20% των ασθενών επανακτούν λειτουργική ανεξαρτησία στους 6 μήνες(1).

Με βάση την υποκείμενη αιτία η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Η πρωτοπαθής ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (ΠΕΑ) αντιστοιχεί στο 78-88% των περιπτώσεων, προκαλείται από την αυτόματη ρήξη των μικρών διαπιτραινώντων αγγείων του εγκεφάλου τα οποία έχουν εκφυλιστικές αλλοιώσεις χρόνιας υπέρτασης ή αμυλοειδωσικής αγγειοπάθειας (ΑΑ)(2). Η αιμορραγία μπορεί να επεκταθεί στις κοιλίες του εγκεφάλου ή σε σπάνιες περιπτώσεις στον υπαραχνοειδή χώρο(3). Η πρωτοπαθής ενδοκοιλιακή αιμορραγία είναι μια σπάνια μορφή ΠΕΑ(4). Η δευτεροπαθής ενδοεγκεφαλική αιμορραγία συμβαίνει στις περιπτώσεις στις οποίες η αιμορραγία οφείλεται σε άλλες αιτίες όπως τραύμα, όγκοι, ρήξη ανευρύσματος, αγγειακή δυσπλασία, διαταραχές πήξης κ.ά.(3). Σε κάθε περίπτωση ΕΑ θα πρέπει να γίνεται έλεγχος για αποκάλυψη πιθανών δευτεροπαθών αιτιών για το λόγο ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος υποτροπής της αιμορραγίας και διαφορετικές θεραπευτικές επιλογές. Οι πιο συχνές περιοχές ΕΑ είναι τα βασικά γάγγλια, ο θάλαμος, η υποφλοιώδης λευκή ουσία των ημισφαιρίων, η παρεγκεφαλίδα και το στέλεχος.

Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά

Η επίπτωση παγκοσμίως της ΕΑ κυμαίνεται σε 10-20 περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμό(5) και αυξάνεται με την ηλικία(5). Στη μαύρη φυλή(5) και στους Ιάπωνες(6) η συχνότητα της είναι σχεδόν διπλάσια απ' ότι στους λευκούς(7) (50/100.000 και 55/100.000 αντίστοιχα). Η ΕΑ είναι περισσότερο συχνή στους άνδρες παρά στις

γυναίκες και ιδιαίτερα σε ηλικίες μεγαλύτερες των 55 ετών(8). Έχει αναφερθεί(9) μια διακύμανση, ημερήσια και ετήσια, της εμφάνισης της ΕΑ. Συγκεκριμένα η ΕΑ παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης τις πρωινές ώρες και το χειμώνα το οποίο αποδίδεται σε μεγαλύτερο συμπαθητικό τόνο των αγγείων και αυξημένη αρτηριακή πίεση αυτές τις περιόδους.

Αιτίες ΕΑ

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι κύριες αιτίες πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς ΕΑ.

Πρωτοπαθής ΕΑ

1. υπέρτασική
2. αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια

Δευτεροπαθής ΕΑ

3. Τραύμα συμπεριλαμβανομένης και της όψιμης μετατραυματικής αποπληξίας
4. Ρήξη αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας, σπανιότερα φλεβώδους, σηραγγώδους ή μηνιγγοαγγειακής
5. Ρήξη σακοειδούς ανευρύσματος, σπανιότερα ατροκτοειδούς ή μυκωτικού
6. Διαταραχές πήξης: λευχαιμία, απλαστική αναιμία, θρομβοκυτταροπενική πορφύρα, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, ηπατοπάθεια, διαταραχές αιμοπεταλίων, επιπλοκές αντιπηκτικής ή θρομβολυτικής φαρμακευτικής αγωγής, αιμοφιλία κα
7. Αιμορραγική μετατροπή ισχαιμικού ΑΕΕ
8. Θρόμβωση φλεβώδους κόλπου
9. Αιμορραγία σε πρωτοπαθείς ή μεταστατικούς όγκους του εγκεφάλου
10. Σηραγγώδες αγγείωμα
11. Χρήση κοκαΐνης, αμφεταμινών, έκσταση ή συμπαθητικομιμητικών αμινών
12. Αγγειίτιδα του ΚΝΣ
13. Διάφορα σπάνια αίτια: ερπητική εγκεφαλίτιδα, Μογανογα, διαχωρισμός σπονδυλικής αρτηρίας, οξεία νεκρωτική αιμορραγική εγκεφαλίτιδα, άνθρακας, τουλαραιμία κα

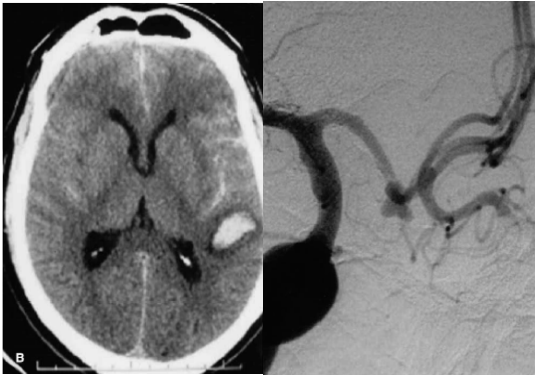
Η βλάβη των μικρών αρτηριών και των αρτηριολίων λόγω χρόνιας αρτηριακής υπέρτασης είναι η κύρια αιτία ΠΕΑ(10). Η ΑΑ του εγκεφάλου είναι επίσης μια αιτία ΠΕΑ με συνηθέστερη εντόπιση της αιμορραγίας στους λοβούς. Οφείλεται σε εναπόθεση ενός πεπτιδίου του β-αμυλοειδούς στα αγγεία του εγκεφάλου και των μηνίγγων(11). Και οι δύο αιτίες θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω.

ΕΑ στο θάλαμο σε ένα 57χρονο άνδρα με ιστορικό χρόνιας υπέρτασης.

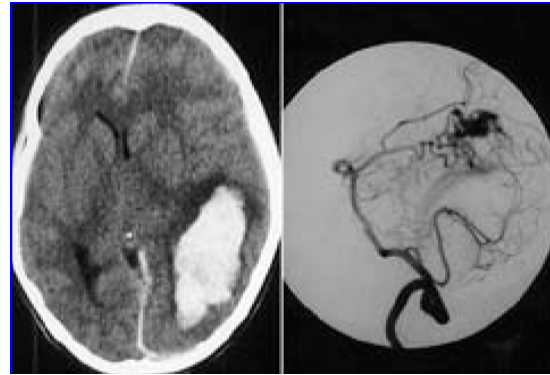


Οι αγγειακές ανωμαλίες είναι η δεύτερη σε συχνότητα αιτία ΕΑ. Σε ρήξη σακκοειδούς ανευρύσματος μέσου μεγέθους ενδοκράνιας αρτηρίας με αποτέλεσμα την ΕΑ σχεδόν πάντα συνυπάρχει υπαραχνοειδής αιμορραγία και αρκετά συχνά παρατηρείται ενδοκοιλιακή επέκταση της αιμορραγίας(3). Χωρίς χειρουργική αντιμετώπιση του ανευρύσματος ο κίνδυνος υποτροπής της αιμορραγίας ανέρχεται στο 50% μέσα στο πρώτο 6μηνο από το αρχικό επεισόδιο(12). Οι αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες (AVM) χαρακτηρίζονται από συνύπαρξη αρτηριακών και φλεβικών κλάδων, διαφόρων διαμετρημάτων με παρουσία αναστομών μεταξύ τους(13) και παρουσιάζουν σαφή αγγειογραφική απεικόνιση. Η ΕΑ είναι η πιο συχνή κλινική τους εκδήλωση. Υπάρχει 18% ετήσια πιθανότητα υποτροπής της ΕΑ λόγω AVM γι' αυτό συνίσταται εμβολισμός, χειρουργική εξαίρεση ή ακτινοβολία(13). Οι φλεβώδεις δυσπλασίες, στις οποίες απουσιάζει το αρτηριακό σκέλος αλλά υπάρχει ανώμαλη διάταση των φλεβιδίων, έχουν μικρή ετήσια συχνότητα ΕΑ (0,15%). Τα σηραγγώδη αιμαγγειώματα είναι συγγενείς αγγειακές ανωμαλίες που αποτελούνται από ανώμαλα τριχοειδικά αγγεία ενώ ανάμεσά τους παρεμβάλλεται συνδετικός ιστός(3). Όλο και περισσότερο αναγνωρίζονται ως αιτίες ΕΑ κυρίως λόγω της υψηλής διαγνωστικής ικανότητας της MRI. Κλινικά μπορούν να εκδηλωθούν με επιληπτικές κρίσεις (27-70%), ΕΑ (10-30%) ή με προοδευτική νευρολογική σημειολογία. Η ετήσια συχνότητα

υποτροπής της ΕΑ είναι 4,5% και μπορεί να μειωθεί με χειρουργική εξαίρεση ή ακτινοβολία(3).



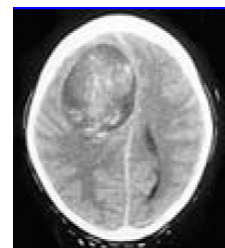
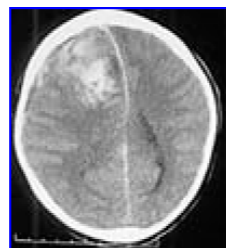
ΕΑ και υπαραχνοειδής αιμορραγία σε 68χρονο με ανεύρυσμα της πρόσθιας αναστομωτικής αρτηρίας



ΕΑ σε 27χρονο άνδρα με αρτηριοφλεβώδη δυσπλασία

Αυτόματη ΕΑ απαντάται σε ποσοστό έως και 10% των πρωτοπαθών ή δευτεροπαθών όγκων του εγκεφάλου. Η αιμορραγία είναι πιθανή σε διάφορες κατηγορίες όγκων όπως στο γλοιοβλάστωμα, στο ολιγοδενδρογλοίωμα και στο αιμαγγειοβλάστωμα. Δευτεροπαθείς όγκοι με μεγάλη αναλογία αιμορραγίας είναι το κακόηθες μελάνωμα και οι μεταστάσεις από καρκίνο του πνεύμονα, του νεφρού και του προστάτη. Η οδοντωτή παρυφή της ΕΑ στον απεικονιστικό έλεγχο όπως επίσης και η πρόσληψη σκιαγραφικού είναι ενδεικτικά αιμορραγίας σε έδαφος όγκου(14).

1ο και 2ο επεισόδιο ΕΑ σε 4χρονο κοριτσάκι λόγω νευροεκτοδερμικού όγκου.



Ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια ή διαταραχές πήξης οποιασδήποτε αιτιολογίας βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ΕΑ(15). Το ήπαρ είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των περισσότερων από τους παράγοντες πήξης και του ινοδογώνου, ενώ επιπλέον παίζει κύριο λόγο στον μεταβολισμό των αιμοπεταλίων. Οι ασθενείς με αιμορροφιλία είναι επιρρεπείς στην ανάπτυξη αυτόματης ή μετατραυματικής ΕΑ. Η ΕΑ είναι συχνή αιτία θανάτου σε ασθενείς με ανεπάρκεια των παραγόντων VII και IX. Διάφοροι τύποι

αιματολογικών νεοπλασιών όπως λεμφοκυτταρική λευχαιμία, οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία, ιδιοπαθής πολύκυτταραιμία μπορούν να προκαλέσουν ΕΑ.

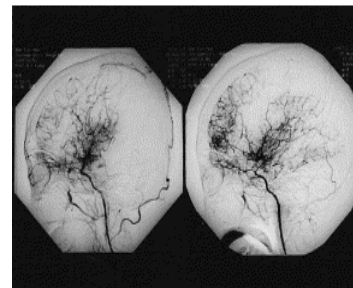
Η συμβατική αντιπηκτική θεραπεία αυξάνει τον κίνδυνο πρόκλησης ΕΑ κατά 7-10 φορές(16). Η χρήση επίσης θρομβολυτικών παραγόντων μπορεί να επιπλέξει ΕΑ σε ποσοστό έως 6,5%(17). Σε μια μετα-ανάλυση λήψης ασπιρίνης προέκυψε μια μικρή αύξηση του κινδύνου πρόκλησης ΕΑ(18).

**Ασθενής που ελάμβανε Sintrom
για χρόνια κοιλιακή μαρμαρυγή
με INR=2,9**



Η νόσος Moyamoya είναι μια σπάνια διαταραχή με τμηματική στένωση ή απόφραξη των τελικών τμημάτων και των δύο έσω καρωτίδων και ανάπτυξη ενός εκτεταμένου δικτύου μικρών αναστομωτικών αγγείων στη βάση του κρανίου και στα βασικά γάγγλια. Αν και η εγκεφαλική ισχαιμία είναι το πρώτο σύμπτωμα στα παιδιά που πάσχουν από τη νόσο, η ΕΑ είναι το πιο συχνό πρώτο σύμπτωμα στους ενήλικους(19).

**Νόσος Moyamoya σε
26χρονη με ΕΑ**



Από τα συμπαθητικομιμητικά φάρμακα η φαινυλπροπανολαμίνη(20) ευθύνεται σε μεγαλύτερη συχνότητα για πρόκληση ΕΑ. Η εφεδρίνη, η ψευδοεφεδρίνη και η φαινκυκλιδίνη έχουν επίσης συσχετισθεί με ΕΑ(21). Ένα φυτικό προϊόν το ginkgo biloba, το οποίο χρησιμοποιείται ως "βοηθητικό" της μνήμης έχει επίσης ενοχοποιηθεί για ΕΑ(22). Από τις απαγορευμένες ουσίες(23) η κοκαΐνη, οι αμφεταμίνες και το έκσταση έχουν συσχετισθεί με ΕΑ με πιθανότερο μηχανισμό την δευτεροπαθή αύξηση της αρτηριακής πίεσης.

Η εγκυμοσύνη και η λοχειά έχουν συσχετισθεί με ΕΑ σε συχνότητα 1-5/10.000 περιπτώσεις(24), ως αποτέλεσμα της θρόμβωσης των φλεβωδών κόλπων ή εκλαμψίας.

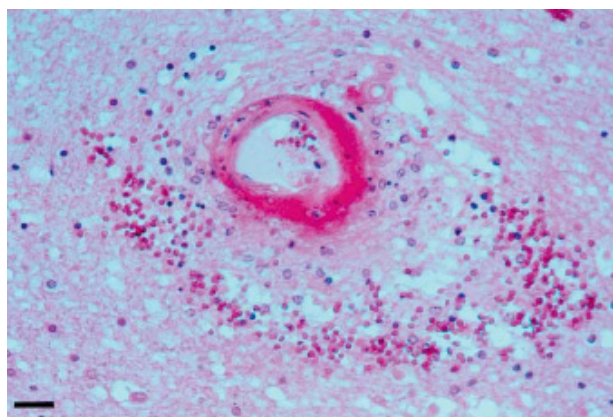
***Ινιακή αιμορραγία σε 24χρονη
2 ημέρες μετά τον τοκετό***



Παράγοντες κινδύνου

Διάφοροι παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση ΠΕΑ. Η αρτηριακή υπέρταση είναι ο πιο συχνός και ο πιο σημαντικός παράγοντας για ΠΕΑ(25) και ευθύνεται για το 60-70% των ΠΕΑ(26). Η χρόνια αρτηριακή υπέρταση προκαλεί εκφύλιση, διάσπαση και ινδοειδή νέκρωση των μικρών διαπιτραινόντων αρτηριών του εγκεφάλου με αποτέλεσμα την αυτόματη ρήξη(10). Μερικές φορές ανευρίσκονται μικροανευρύσματα (Charcot-Bouchard) στα σημεία ρήξης των αγγείων. Η υπερτασική ΕΑ συνήθως συμβαίνει στα βασικά γάγγλια (φακοειδής πυρήνας, θάλαμος, κερκοφόρος πυρήνας), στη γέφυρα και στην παρεγκεφαλίδα(3). Η μη συμμόρφωση με την αντιυπερτασική αγωγή αυξάνει τον κίνδυνο για ΠΕΑ(27) ενώ η καλή ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης τον μειώνει(28). Παρόλα αυτά ο σχετικός κίνδυνος για πρόκληση ΠΕΑ σε υπερτασικούς ασθενείς είναι 3,9 με 13,3 φορές μεγαλύτερος απ' ότι στους μη υπερτασικούς(29). Η συχνότητα όμως επανεμφάνισης υπερτασικής ΕΑ είναι χαμηλή(27) περίπου 2% το χρόνο όταν υπάρχει καλή ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης.

***Ινδοειδής νέκρωση σε
ασθενή με χρόνια
υπέρταση***



Η δεύτερη σε συχνότητα αιτία για την πρόκληση ΠΕΑ είναι η αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια του εγκεφάλου (AA) η οποία ευθύνεται για το 15% των περιπτώσεων(3). Η AA χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση ενός πεπτιδίου του β-αμυλοειδούς στα μικρού

και μεσαίου μεγέθους αγγεία του εγκεφάλου και των λεπτομηνίγγων με αποτέλεσμα την αυξημένη ευθραυστότητα των αγγείων. Κλινικά είναι ασυμπτωματική ή χαρακτηρίζεται από λοβιακή ΕΑ σε ηλικιωμένα άτομα με ιστορικό έκπτωσης μνήμης. Η συχνότητα όμως επανεμφάνισης της ΕΑ σε ΑΑ είναι σχετικά υψηλή και ανέρχεται σε 5-15% των ασθενών το χρόνο(30). Επιπλέον βρέθηκε ότι η παρουσία των αλληλομόρφων ε2 και ε4 του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης Ε τριπλασιάζει τον κίνδυνο επανεμφάνισης ΕΑ σε ασθενείς με ιστορικό λοβιακής ΕΑ λόγω ΑΑ(31). Τα αλληλόμορφα αυτά σχετίζονται με αυξημένη εναπόθεση του β-αμυλοειδούς και εκφυλιστικές αλλοιώσεις στο τοίχωμα των αγγείων αντίστοιχα.

Η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ επίσης αυξάνει τον κίνδυνο πρόκλησης ΕΑ μέσω διαταραχής του πηκτικού μηχανισμού ή άμεσης επίδρασης του αλκοόλ στην ακεραιότητα του αγγειακού τοιχώματος(32, 33).

Η μειωμένη χοληστερόλη του αίματος (<160mg/dl) έχει επίσης συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για ΠΕΑ(34) αλλά ο υποκείμενος μηχανισμός δεν είναι γνωστός. Πιστεύεται ότι ο συνδυασμός αυξημένης διαστολικής πίεσης και χαμηλών επιπέδων χοληστερόλης εξασθενίζει την ανθεκτικότητα του ενδοθηλίου των εγκεφαλικών αρτηριών(35).

Άλλοι παράγοντες κινδύνου για ΠΕΑ είναι το κάπνισμα(36), η χρήση αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων(37), η λοίμωξη από ηπατίτιδα C(38) και ο σακχαρώδης διαβήτης(39).

Κλινική εικόνα

Η νευρολογική εικόνα των ασθενών με ΕΑ ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και την εντόπιση του αιματώματος.

Η οξεία αντιδραστική υπέρταση η οποία ξεπερνά κατά πολύ τα επίπεδα της χρόνιας υπέρτασης του ασθενή, αποτελεί χαρακτηριστικό εύρημα που τυπικά υποδηλώνει αιμορραγία. Συναντάται σε μέτριου και μεγάλου μεγέθους εν τω βάθει αιματώματα.

Η διαταραχή του επιπέδου συνείδησης(40) είναι ένα συχνό εύρημα σε ασθενείς με ΕΑ και οφείλεται στην αυξημένη ενδοκράνιο πίεση ή στην άμεση συμπίεση από το αιμάτωμα του δικτυωτού ενεργοποιητικού σχηματισμού του στελέχους και του θαλάμου(41).

Εμετός κατά την έναρξη παρατηρείται πολύ πιο συχνά σε περίπτωση αιμορραγίας παρά σε περίπτωση ισχαιμικού εμφράκτου(40). Ισχυρή κεφαλαλγία θεωρείται γενικά ότι συνοδεύει την ΕΑ και αυτό συμβαίνει πράγματι στις πιο πολλές περιπτώσεις(42).

Η αυχενική δυσκαμψία αποτελεί συχνό εύρημα, αλλά όμως απουσιάζει αρκετά συχνά. Είναι χαρακτηριστικό ότι η αυχενική δυσκαμψία εξαφανίζεται καθώς το κώμα γίνεται πιο βαθύ(42).

Επιληπτικές κρίσεις, συνήθως εστιακές παρατηρούνται στις πρώτες μέρες σε 10% των υπερσκηνιδιακών αιμορραγιών, σπανίως κατά τη διάρκεια του επεισοδίου και πιο συχνά με καθυστέρηση μηνών ή ετών μετά την αιμορραγία(43).

Οι βυθοί συχνά παρουσιάζουν υπερτασικές αλλοιώσεις των αρτηριδίων. Σπανίως παρατηρούνται αιμορραγίες στον αμφιβληστροειδή με λευκό κέντρο (κηλίδες του Roth) ή υποϋαλοειδικές αιμορραγίες.

Η οφθαλμική σημειολογία είναι ιδιαίτερος σημαντική για την εντόπιση των ΕΑ. Στην αιμορραγία στο κέλυφος οι οφθαλμοί αποκλίνουν προς την αντίθετη προς την παράλυση πλευρά ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην παρεγκεφαλιδική αιμορραγία. Στην αιμορραγία του θαλάμου, η πιο συχνή διαταραχή είναι η απόκλιση των οφθαλμών προς τα κάτω, ενώ οι κόρες μπορεί να μην αντιδρούν. Στην αιμορραγία της γέφυρας οι βολβοί είναι καθηλωμένοι και οι κόρες είναι πολύ στενές, αλλά αντιδρούν στο φως.

Ασθενείς με υπερσκηνιδιακή αιμορραγία στο κέλυφος του φακοειδούς πυρήνα, στον κερκοφόρο πυρήνα ή στο θάλαμο μπορεί να παρουσιάσουν, αντίπλευρα, ημιπληγία και ημιϋπαισθησία η βαρύτητα των οποίων εξαρτάται από το βαθμό συμμετοχής της έσω κάψας. Επίσης μπορεί να υπάρχουν συμπτώματα τα οποία υποδηλώνουν συμμετοχή του φλοιού, όπως αφασία, παραμέληση (neglect), ημιανοψία, συζυγή στροφή του βλέμματος. Στην περίπτωση αυτή η σημειολογία οφείλεται στη λειτουργική συμπίεση του φλοιού ή στη διάσχιση των νευρικών ινών στην υποφλοιώδη λευκή ουσία(44).

Στις υποσκηνιδιακές αιμορραγίες υπάρχουν συμπτώματα δυσλειτουργίας του στελέχους όπως διαταραχές των κρανιακών νεύρων, στροφή του βλέμματος και αντίπλευρη ημιπληγία. Η αταξία, ο νυσταγμός και η δυσμετρία είναι κυρίαρχα σε ενδοπαρεγκεφαλιδική αιμορραγία(45).

Τέλος, η δυσαυτονομία με τη μορφή του κεντρικού πυρετού, του υπεραερισμού, της υπεργλυκαιμίας, και των διαταραχών του καρδιακού ρυθμού είναι συχνά ευρήματα σε ΕΑ(1).

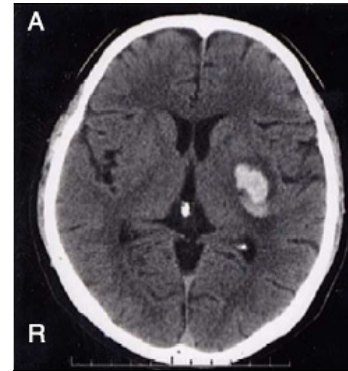
Δεν υπάρχει κάποια ηλικιακή προδιάθεση αν και η μέση ηλικία είναι μικρότερη από ότι στο θρομβωτικό ΑΕΕ, ενώ δεν υπάρχει συσχέτιση με το φύλο. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η αιμορραγία παρουσιάζεται όταν ο ασθενής είναι σε εγρήγορση και δράση, ενώ αντίθετα η έναρξή της σε κατάσταση ύπνου είναι σπάνιο φαινόμενο.

Παρακάτω εκτίθενται αναλυτικά τα συμπτώματα αναλόγως της εντόπισης της ΕΑ:

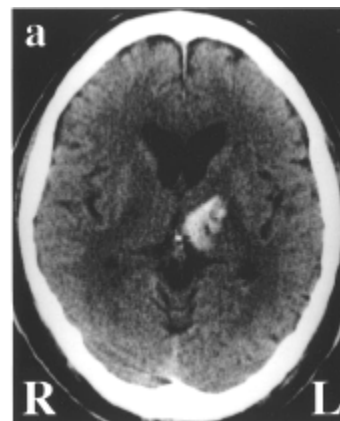
Αιμορραγία στο κέλυφος: είναι η πιο συχνή εντόπιση της ΠΕΑ και συνήθως επεκτείνεται προς την έσω κάψα. Τα νευρολογικά συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με το μέγεθος και την ακριβή εντόπιση της εξαγγείωσης. Η ημιπληγία λόγω διατομής της παρακείμενης έσω κάψας αποτελεί ένα σταθερό χαρακτηριστικό. Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί δυσχέρεια στην ομιλία, απόκλιση των οφθαλμών προς την πλευρά της βλάβης, εμφάνιση σημείου Babinski

αρχικά ετερόπλευρα και στη συνέχεια αμφοτερόπλευρα. Είναι επίσης δυνατό σε μεγαλύτερα αιματώματα να υπάρχει διαταραχή του επιπέδου συνείδησης, διαταραχές αναπνοής και κόρης και σημεία απεγκεφαλισμού. Στις αιμορραγίες που εντοπίζονται στο πρόσθιο τμήμα του κελύφους του φακοειδούς πυρήνα, η ημιπληγία και η επίταση των τενοντίων αντανάκλασεων τείνουν να είναι λιγότερο βαριές και υποχωρούν ταχύτερα. Επιπλέον παρατηρείται έντονη αβουλία, απώλεια ακρίβειας των κινήσεων, παροδική ετερόπλευρη παραμέληση (neglect), και σε περίπτωση προσβολής του αριστερού ημισφαιρίου, κινητικού τύπου αφασία και δυσγραφία. Σε περίπτωση οπισθίων βλαβών, η αδυναμία είναι και πάλι ηπιότερη και συνοδεύεται από απώλεια της αισθητικότητας, ημιανοψία, εξασθενημένη βλεμματική παρακολούθηση προς την αντίθετη πλευρά, αφασία τύπου Wernicke (σε βλάβες του αριστερού ημισφαιρίου) και νοσοαγνωσία (σε βλάβες του δεξιού ημισφαιρίου)(46).

Αιμορραγία στο θάλαμο: Σε μεσαίου ή μεγάλου μεγέθους αιμορραγία του θαλάμου μπορεί να προκληθεί ημιπληγία ή ημιπάρεση αναλόγως του βαθμού συμμετοχής της παρακείμενης έσω κάψας. Η διαταραχή της αισθητικότητας είναι συνήθως σοβαρότερη του κινητικού



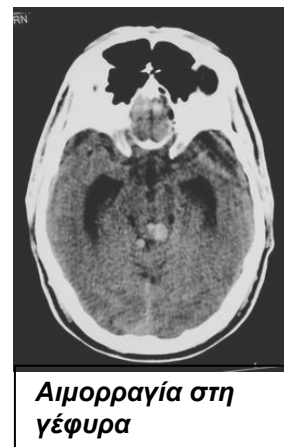
Αιμορραγία στο κέλυφος σε άρρνεα ασθενή 52 ετών με ιστορικό ΑΥ από 5ετίας



Αιμορραγία στο θάλαμο σε 42χρονο υπερτασικό ασθενή

ελλείμματος και περιλαμβάνει όλη την αντίθετη πλευρά. Σε βλάβες του επικρατούντος ημισφαιρίου μπορεί να αναπτυχθεί αφασία Wernicke, ενώ ετερόπλευρη παραμέληση παρατηρείται μετά από βλάβες στο μη επικρατούν ημισφαίριο. Σε περίπτωση συμπίεσης από το αιμάτωμα της παρακείμενης τρίτης κοιλίας μπορεί να διαταραχθεί η παροχέτευση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού με αποτέλεσμα τη διάταση των πλάγιων κοιλιών, ενώ η συνύπαρξη ενδοκοιλιακής αιμορραγίας συνεπάγεται σχεδόν πάντα την πρόωμη ανάπτυξη υδροκεφαλίας. Επέκταση της αιμορραγίας στον υποθάλαμο και τον ανώτερο μεσεγκέφαλο μπορεί να προκαλέσει μια σειρά διαταραχών της κινητικότητας των οφθαλμών, ανισοκορία, σύνδρομο Horner και νυσταγμό(47).

Αιμορραγία στη γέφυρα: Στις περιπτώσεις αυτές συνήθως σε σύντομο χρονικό διάστημα εγκαθίσταται βαθύ κώμα, με τετραπληγία, απεγκεφαλισμό, κατάργηση του οφθαλμο-κεφαλικού και αιθουσο-οφθαλμικού αντανακλαστικού και κόρες σε μύση, μεγέθους κεφαλής καρφίτσας αλλά με διατήρηση του φωτοκινητικού αντανακλαστικού. Η πρόγνωση είναι συνήθως βαριά(48). Όταν όμως η αιμορραγία είναι μικρότερου μεγέθους και εντοπίζεται στην καλύπτρα η κλινική εικόνα μπορεί να είναι πιο ελαφρά και με καλή απώτερη λειτουργική αποκατάσταση(49).

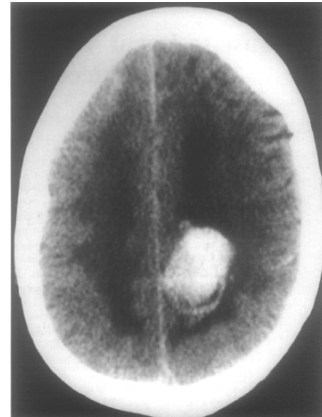


Παρεγκεφαλιδική αιμορραγία: αντιστοιχεί στο 10% των ΠΕΑ. Συχνά συμπτώματα αποτελούν η ινιακή κεφαλαλγία, οι συνεχείς έμετοι, ο ίλιγγος και η αδυναμία ορθοστάτησης και βάδισης του ασθενούς. Οι κλασσικές παρεγκεφαλιδικές δοκιμασίες και ο νυσταγμός μπορεί συχνά να απουσιάζουν. Σε μεγαλύτερα αιματώματα με πίεση του στελέχους και της τέταρτης κοιλίας και ανάπτυξη υδροκεφάλου μπορεί να υπάρχει σπαστική τετραπάρεση, απόκλιση των οφθαλμών, κώμα και διαταραχές της αναπνοής(50, 51).

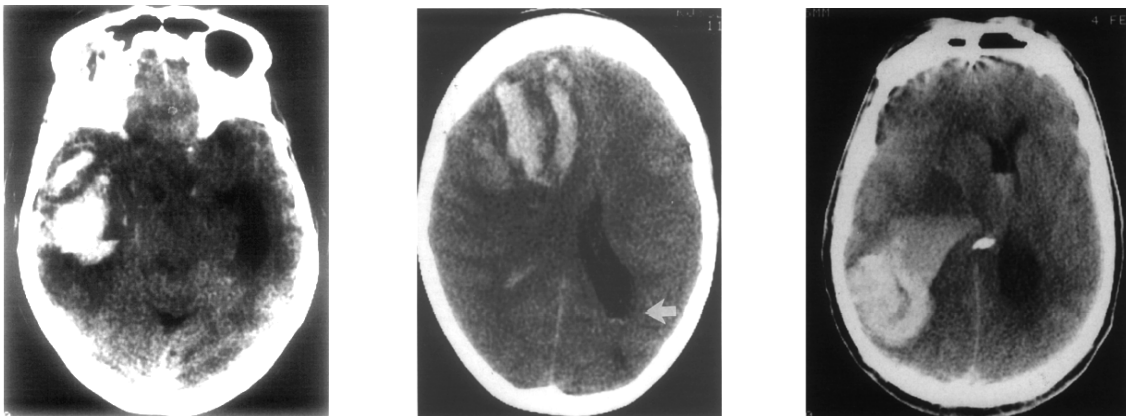
Αιμορραγία εντός της παρεγκεφαλίδας σε υπέρτατικό ασθενή, 82 ετών, που προσήλθε με κεφαλαλγία, έμετους και προοδευτική επιδείνωση του επιπέδου συνείδησης.



Λοβώδης αιμορραγία: αντιστοιχεί στο 7-32% των ΠΕΑ και οφείλονται σε ΑΑ του εγκεφάλου ή σε αρτηριακή υπέρταση. Η κλινική εικόνα ποικίλει ανάλογα με την εντόπιση. Σε μετωπιαία ΕΑ παρατηρείται ετερόπλευρη ημιπάρεση, αβουλία και συζυγής απόκλιση του βλέμματος προς την πλευρά της βλάβης. Όταν το αιμάτωμα εντοπίζεται στον βρεγματικό λοβό μπορεί να προκληθεί ημιϋπαισθησία, ημιανοψία ή ετερόπλευρη παραμέληση. Εντόπιση της ΕΑ στον κροταφικό και ινιακό λοβό συνεπάγεται αφασικές διαταραχές και ημιανοψία αντίστοιχα(52).



80 ετών άνδρας με αιμορραγία στο βρεγματικό λοβό



Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία κροταφικά, μετωπιαία και βρεγματικά αντίστοιχα

Η ΠΕΑ σπάνια εντοπίζεται στον κερκοφόρο πυρήνα(53), στο μεσεγκέφαλο(54), στον προμήκη(55) και στην έσω κάψα(56).

Δευτεροπαθής επιδείνωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς:

Το 25% περίπου των ασθενών με ΕΑ, οι οποίοι είναι αρχικά σε εγρήγορση, παρουσιάζουν επιδείνωση του επιπέδου συνείδησης εντός 24 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων(57). Οι κύριοι παράγοντες που εμπλέκονται στην επιδείνωση της κλινικής συμπτωματολογίας είναι η επέκταση του αιματώματος και η ανάπτυξη

οιδήματος(58). Έχει βρεθεί ότι η αύξηση του όγκου του αιματώματος παρατηρείται σε ένα ποσοστό έως και 38% των ασθενών με ΠΕΑ, συνήθως μέσα σε 3 ώρες από την έναρξη της αιμορραγίας(29), το οποίο σημαίνει ενεργό αιμορραγία, ενώ η αύξηση της αιμορραγίας μετά το 24ωρο είναι σπάνια(59). Διάφοροι παράγοντες κινδύνου έχουν ενοχοποιηθεί για την επέκταση του αιματώματος όπως το ιστορικό ισχαιμικού ΑΕΕ, οι ηπατοπάθειες, ο σακχαρώδης διαβήτης, η βαριά κατανάλωση αλκοόλ, τα χαμηλά επίπεδα ινοδωγόνου, το ανώμαλο σχήμα του αιματώματος(60, 61). Η εντόπιση της ΠΕΑ δεν φαίνεται να έχει επίδραση στον κίνδυνο επέκτασης του αιματώματος(1). Οι μηχανισμοί οι οποίοι οδηγούν στην αύξηση του όγκου του αιματώματος κατά τις πρώτες ώρες της ΕΑ παραμένουν ασαφείς. Η συνεχιζόμενη αιμορραγία από το σημείο της αρχικής ρήξης σε συνδυασμό με την δευτεροπαθή αρτηριακή υπέρταση μπορεί να προκαλέσει την αύξηση του αιματώματος(62). Επίσης, η αιφνίδια αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης (ICP), η τοπική διάσχιση των ιστών από το αιμάτωμα και η παραμόρφωση της φυσιολογικής ανατομίας του εγκεφάλου μπορεί σε κάποιους ασθενείς να οδηγήσει στη δημιουργία δορυφόρων μικροαιμορραγιών σε παρακείμενες θέσεις του αρχικού αιματώματος. Η συνένωση όλων αυτών των αιμορραγιών στην περιφέρεια του αρχικού αιματώματος συνεπάγεται την αύξηση του αρχικού όγκου(63). Άλλοι τοπικοί παράγοντες στον παρακείμενο του αιματώματος εγκεφαλικό ιστό που μπορεί να οδηγήσουν στην επέκταση της αιμορραγίας είναι η παροδική ισχαιμία, η ρήξη επιπλέον αγγείων λόγω διαταραχής της φλεβικής παροχέτευσης, η καταστροφή του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού και η παροδική τοπική διαταραχή των μηχανισμών πήξης(64).

Γρήγορη επέκταση του αιματώματος. Οι αξονικές τομογραφίες έχουν ληφθεί μία και έξι ώρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων αντίστοιχα.



Η ανάπτυξη και επέκταση του εγκεφαλικού οιδήματος επίσης εμπλέκεται στην επιδείνωση του επιπέδου συνείδησης και συμβαίνει 24 με 48 ώρες μετά την έναρξη της ΕΑ(57). Πιο σπάνια, μπορεί να παρατηρηθεί καθυστερημένη ανάπτυξη οιδήματος και κλινική επιβάρυνση του ασθενούς κατά την δεύτερη με τρίτη εβδομάδα μετά την ΕΑ(65).

Πρόγνωση και πορεία

Γενικά η ΠΕΑ έχει χειρότερη πρόγνωση από το ισχαιμικό ΑΕΕ(66). Η θνητότητα μετά από ΠΕΑ κυμαίνεται από 23 έως 58% τους πρώτους έξι μήνες(67) με την πλειονότητα των θανάτων να συμβαίνουν τις πρώτες ημέρες μετά από ΠΕΑ(68), ενώ η συχνότητα υποτροπής παραμένει χαμηλή, περίπου 2,4%(69). Η πλειοψηφία των μελετών επικεντρώνονται στα ποσοστά επιβίωσης και σε προγνωστικούς παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένη θνητότητα. Τελευταία όμως οι ερευνητές έχουν επεκταθεί και σε διάφορες νευρολογικές και λειτουργικές μετρήσεις με αποτέλεσμα την πιο λεπτομερειακή καταγραφή της έκβασης. Πολλαπλοί κλινικοί και ακτινολογικοί προγνωστικοί παράγοντες έχουν αναδειχθεί κατά τις διάφορες μελέτες τους οποίους θα παραθέσουμε συνοπτικά παρακάτω:

Ηλικία: η συχνότητα της ΠΕΑ αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας. Επίσης, η προχωρημένη ηλικία έχει βρεθεί να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση(70). Στις διάφορες μελέτες η ηλικία εξετάζεται ως συνεχής μεταβλητή ή οι ασθενείς ομαδοποιούνται σε δύο κατηγορίες με ηλικιακό όριο που κυμαίνεται από 45 έως 80 έτη(68).

Φύλο: οι περισσότερες μελέτες δεν έδειξαν επίδραση του φύλου στην έκβαση των ασθενών με ΠΕΑ(71). Παρόλα αυτά κάποιοι ερευνητές αναφέρουν αυξημένη ενδονοσοκομειακή θνητότητα(72) ή μεγαλύτερη λειτουργική ανεξαρτησία στους άρρενες(73).

Όγκος του αιματώματος: είναι ισχυρός προγνωστικός δείκτης θνητότητας και λειτουργικής αποκατάστασης(68, 71). Όγκος αιματώματος μεγαλύτερος από 30ml θεωρείται ότι επιβαρύνει σημαντικά την κλινική εικόνα του ασθενούς(68).

Εντόπιση του αιματώματος: οι αιμορραγίες στο στέλεχος σχετίζονται με τη χειρότερη πρόγνωση με τη θνητότητα τον πρώτο μήνα να ανέρχεται, σε μερικές μελέτες, στο 100%(74). Στα βασικά γάγγλια ή στο θάλαμο η αντίστοιχη θνητότητα κυμαίνεται από

20-40%, ενώ οι λοβώδεις αιμορραγίες έχουν γενικά την καλύτερη πρόγνωση(71). Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω των επιπλοκών των ΠΕΑ στα βασικά γάγγλια που είναι η ενδοκοιλιακή επέκταση της αιμορραγίας ή η δημιουργία υδροκεφάλου.

Επίπεδο συνείδησης κατά την εισαγωγή: πληθώρα ερευνητών έχουν αναγνωρίσει την μεγάλη αξία του αρχικού επιπέδου συνείδησης στην έκβαση των ασθενών(70, 75). Η εκτίμηση του επιπέδου συνείδησης γίνεται συνήθως με την κλίμακα κώματος της Γλασκώβης (GCS)(68).

Ενδοκοιλιακή επέκταση: υπάρχει σαφής συσχέτιση της ενδοκοιλιακής επέκτασης της αιμορραγίας με κακή έκβαση. Σε μια μελέτη βρέθηκε σε ποσοστό 40% των υπερτασικών αιμορραγιών με τη θνητότητα να αυξάνεται από 21% σε 60%(76).

Άλλοι προγνωστικοί παράγοντες που έχουν αναδειχθεί σε διάφορες μελέτες είναι η δημιουργία υδροκεφάλου(72), το φαινόμενο μάζας(57) του αιματώματος με τη μέτρηση της μετάθεσης της μέσης γραμμής, η επέκταση της αιμορραγίας(29), η υψηλή αρτηριακή πίεση εισόδου(77).

Σημαντικό είναι επίσης το ενδιαφέρον των μελετητών για την δημιουργία προγνωστικών μοντέλων έτσι ώστε να μπορεί να προβλεφθεί η κλινική πορεία του ασθενούς με βάση κάποια κλινικά και ακτινολογικά στοιχεία κατά την εισαγωγή. Για το σκοπό αυτό έχουν εφαρμοστεί μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression models) για τη αναγνώριση ανεξάρτητων προγνωστικών παραγόντων.

Πρόσφατα, σε μια μελέτη βρέθηκαν ότι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες της βαρύτητας της ΠΕΑ ήταν ο όγκος του αιματώματος, η μεγάλη ηλικία του ασθενούς, η κωματώδης κατάσταση, η ενδοκοιλιακή επέκταση του αιματώματος, και η υποσκληνιδιακή εντόπιση της ΕΑ(68). Όλοι αυτοί οι παράγοντες ενσωματώθηκαν σε μια κλίμακα (ICH score(68)) και βαθμολογήθηκαν ανάλογα με τη στατιστική σημαντικότητα της συσχέτισης. Η κλίμακα αυτή έχει γίνει ευρέως αποδεκτή και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της θνητότητας τον πρώτο μήνα από την εισαγωγή.

ICH score	Βαθμοί
Κλίμακα κώματος Γλασκώβης	
3-4	2
5-12	1
13-15	0
Όγκος αιματώματος (ml)	
≥30	1
<30	0
Ενδοκοιλιακή επέκταση	
ναι	1
όχι	0
Ηλικία (έτη)	
≥80	1
<80	0
Υποσκληνιδιακή εντόπιση	
ναι	1
όχι	0
Θνητότητα τον πρώτο μήνα σε σύνολο βαθμών	
5+	100%
4	97%
3	72%
2	26%
1	13%
0	0%

Παρόλα αυτά η οποιαδήποτε ένδειξη για κακή πρόγνωση δεν θα πρέπει να προδικάζει τις θεραπευτικές προσπάθειες για βελτίωση των ασθενών με ΠΕΑ(78). Σε μια μελέτη βρέθηκε ότι ο κύριος προγνωστικός παράγων έκβασης μετά από ΕΑ ήταν η εφαρμογή της οδηγίας της μη αναζωογόνησης του ασθενούς τις πρώτες 24 ώρες(79). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι νοσηλεία σε εξειδικευμένες νευρολογικές μονάδες εντατικής θεραπείας συνεπάγεται μειωμένη θνητότητα και καλύτερη αποκατάσταση(80).

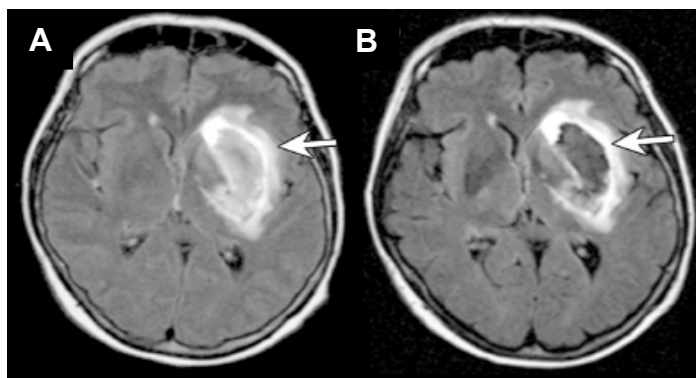
Διάγνωση

Αν και η αιφνίδια έναρξη της κλινικής συμπτωματολογίας και το μειωμένο επίπεδο συνείδησης είναι ενδεικτικά ΕΑ για την οριστική διάγνωση η υπολογιστική τομογραφία εγκεφάλου κατέχει κυρίαρχη θέση. Η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί απολύτως αξιόπιστη όσον αφορά την ανίχνευση των αιμορραγιών που έχουν διάμετρο μεγαλύτερη του 1εκ. Γεφυρικές αιμορραγίες μικρότερου μεγέθους δεν απεικονίζονται με την ίδια αξιοπιστία. Με την αρχική αξονική θα πρέπει να αναγνωριστούν η εντόπιση και το μέγεθος του αιματώματος, η ενδοκοιλιακή ή υπαραχνοειδής επέκταση της αιμορραγίας και η πιθανή ύπαρξη πολλαπλών αιμορραγικών εστιών. Ταυτόχρονα συνυπάρχων υδροκέφαλος, όγκοι του εγκεφάλου και εγκεφαλικό οίδημα με παρεκτόπιση των ενδοκρανιακών δομών μπορούν επίσης να επισημανθούν εύκολα. Ο όγκος του αιματώματος μπορεί εύκολα να υπολογισθεί από την αξονική τομογραφία με βάση τον τύπο ABC/2 στον οποίο Α η μεγαλύτερη διάμετρος του αιματώματος και Β η κάθετη στην Α. Η διάμετρος C η οποία αντιπροσωπεύει το βάθος του αιματώματος μπορεί να υπολογισθεί αν πολλαπλασιάσουμε τον αριθμό των τομών στις οποίες είναι εμφανές το αιμάτωμα επί το πάχος των τομών(81). Η εξαγγείωση σκιαγραφικής ουσίας στην περιοχή του αιματώματος στην αξονική αγγειογραφία υποδηλώνει την επέκταση της αιμορραγίας(82) και συνεπάγεται πτωχή πρόγνωση(83)

Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (MRI) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάδειξη των αιμορραγιών του εγκεφαλικού στελέχους και για τις υπολειμματικές αιμορραγίες, οι οποίες παραμένουν ορατές για πολύ καιρό, ακόμη και όταν αυτές δεν είναι πλέον εμφανείς στην υπολογιστική τομογραφία (μετά από 4-5 εβδομάδες). Η αιμοσιδηρίνη και η χρωστική του σιδήρου έχουν τη δική τους χαρακτηριστική εικόνα. Η ακτινολογική εικόνα της ΕΑ στην MRI μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου και είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε την εξέλιξη αυτή για την αποφυγή διαγνωστικών λαθών. Επίσης η ακτινολογική εικόνα εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού τομογράφου(84).

Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία		Ένταση σήματος συγκριτικά με τον εγκέφαλο	
		T1 ακολουθία	T2 ακολουθία
Υπεροξεία	<24h	Ισόπυκνη	Ελαφρά υπέρπυκνη
Οξεία	1-3 ημέρες	Ελαφρά υπόπυκνη	Έντονα υπόπυκνη
Υποξεία			
πρώιμη	>3 ημέρες	Έντονα υπέρπυκνη	Έντονα υπόπυκνη
όψιμη	>7 ημέρες	Έντονα υπέρπυκνη	Έντονα υπέρπυκνη
Χρόνια			
κέντρο	>14 ημέρες	Ισόπυκνη	Ελαφρά υπέρπυκνη
περιφέρεια		Ελαφρά υπόπυκνη	Έντονα υπόπυκνη

MRI 6 ημέρες μετά την ΕΑ. Ακολουθία FLAIR σε 1.5 και 3T μαγνητικό τομογράφο (Α και Β). Η ΕΑ (βέλη) είναι υπέρπυκνη και υπόπυκνη αντίστοιχα.



Η συμβατική αγγειογραφία είναι η διαγνωστική εξέταση για αποκάλυψη δευτεροπαθών αιτιών ΕΑ. Σε μια μελέτη δεν ευρέθησαν αγγειακές ανωμαλίες σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 45 ετών με ιστορικό υπέρτασης και εντόπιση της αιμορραγίας στις κλασικές υπερτασικές περιοχές (βασικά γάγγλια, παρεγκεφαλίδα, γέφυρα)(85). Παρόλα αυτά βρέθηκαν αγγειακές ανωμαλίες σε 65% των ασθενών με πρωτοπαθή ενδοκοιλιακή αιμορραγία, και σε μη υπερτασικούς ασθενείς με λοβιακή αιμορραγία. Αγγειογραφία θα πρέπει να γίνεται σε μικρότερες ηλικίες και σε μη υπερτασικούς ασθενείς.

Γενικά η οσφυονωτιαία παρακέντηση δεν ενδείκνυται, διότι μπορεί να επιταχύνει ή να επιδεινώσει την μετατόπιση των κεντρικών δομών και τον εγκολεασμό. Ο αριθμός των λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα μπορεί να αυξηθεί παροδικά στις 15000κκx και είναι σχετικά μεγαλύτερος απ' ότι στην εγκεφαλική θρόμβωση. Επίσης σε μερικούς ασθενείς αυξάνεται και η ταχύτητα καθίζησης.

Θεραπεία

Αυτή περιλαμβάνει γενικά μέτρα με την υποστήριξη των ζωτικών σημείων και την αντιμετώπιση των διαφόρων επιπλοκών, όπως αυξημένη αρτηριακή πίεση και πιο ειδικά μέτρα όπως αντιμετώπιση αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης και χειρουργική εκκένωση του αιματώματος.

Αεραγωγοί: Η προστασία των αεραγωγών είναι απαραίτητη σε ασθενείς με πτώση του επιπέδου συνείδησης και απώλεια των αντανακλαστικών που προστατεύουν τις αεροφόρες οδούς. Μια καθυστέρηση στον προστασία των αεραγωγών μπορεί να οδηγήσει σε δευτεροπαθή βλάβη λόγω εισρόφησης, υποξαιμίας και υπερκαπνίας.

Θέση του ασθενούς: Ο ασθενής θα πρέπει να τοποθετείται σε γωνία 30° που βοηθά στην παροχέτευση του φλεβικού αίματος και την αποφυγή πνευμονίας από εισρόφηση σε περίπτωση που υπάρχει μηχανική υποστήριξη.

Αρτηριακή πίεση: Η αυξημένη αρτηριακή πίεση έχει συσχετισθεί με μεγαλύτερες πιθανότητες επιδείνωσης της κλινικής εικόνας του ασθενούς και κακής έκβασης(86). Η υψηλή αρτηριακή πίεση θα πρέπει να διορθώνεται άμεσα για να μειωθεί ο κίνδυνος επέκτασης του αιματώματος, αλλά με προσοχή έτσι ώστε να διατηρηθεί ικανοποιητική πίεση διήθησης στον εγκέφαλο και να αποφευχθεί η ισχαιμία στην περιοχή γύρω από το αιμάτωμα.

Ενδοφλεβίως χορηγούμενα υγρά: Τα ισότονα υγρά όπως 0,9% NaCl (περίπου 1ml/Kg/h) πρέπει να χορηγούνται ενδοφλεβίως στους ασθενείς με EA για τις καθημερινές ανάγκες του οργανισμού. Τα υπότονα υγρά (0,45% NaCl ή 5% dextrose) θα πρέπει να αποφεύγονται γιατί επιδεινώνουν το εγκεφαλικό οίδημα και αυξάνουν την ενδοκράνια πίεση(87). Διαλύματα τα οποία περιέχουν γλυκόζη θα πρέπει γενικά να αποφεύγονται γιατί η υπεργλυκαιμία μπορεί να αποβεί καταστροφική για τον εγκεφαλικό ιστό(88). Μερικά κέντρα χρησιμοποιούν υπέρτονα διαλύματα NaCl με σκοπό τη μείωση του κυτταρικού οιδήματος(89).

Αυξημένη παρακολούθηση του ασθενούς (ΜΕΘ,ΜΑΦ): Οι ασθενείς με ΕΑ παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο επιδείνωσης της νευρολογικής τους εικόνας και εμφάνισης διαταραχών από το καρδιαγγειακό σύστημα το πρώτο 24ωρο μετά την αιμορραγία. Περίπου το 30% των ασθενών με υπερσκηνιδιακή ΕΑ και σχεδόν όλοι οι ασθενείς με αιμορραγία στο στέλεχος ή την παρεγκεφαλίδα παρουσιάζουν πτώση του επιπέδου συνείδησης και έχουν ανάγκη διασωλήνωσης(90). Επομένως πολλοί είναι οι εντατικολόγοι που συστήνουν παρακολούθηση όλων των ασθενών με ΕΑ σε μονάδες εντατικής θεραπείας τουλάχιστον τις πρώτες 24ώρες. Το επίπεδο συνείδησης του ασθενούς θα πρέπει να εκτιμάται ωριαία με βάση την κλίμακα κώματος της Γλασκώβης. Επίσης η αρτηριακή πίεση θα πρέπει να παρακολουθείται συστηματικά ιδιαίτερα στους ασθενείς που χρήζουν ενδοφλέβιας χορήγησης αντιυπερτασικών σκευασμάτων. Η αστάθεια του καρδιαγγειακού σε συνδυασμό με την αυξημένη ενδοκράνια πίεση χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής έτσι ώστε να αποφευχθούν οι καταστροφικές επιδράσεις της υπέρτασης ή υπότασης λόγω περιορισμού της αυτορρυθμιστικής ικανότητας του οργανισμού.

Αντιεπιληπτική προφυλακτική αγωγή: Ο κίνδυνος εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων τον πρώτο μήνα μετά την ΕΑ είναι 8%, ενώ το 1-2% μπορεί να παρουσιάσει status epilepticus. Ένα ποσοστό 5-20% των ασθενών με ΕΑ μπορεί να εμφανίσει στο μέλλον επιληψία. Οι επιληπτικές κρίσεις είναι πιο συχνές σε ασθενείς με λοβιακή αιμορραγία(91). Οι επιληπτικές κρίσεις μπορούν να αντιμετωπιστούν στην οξεία φάση με ενδοφλέβια λοραζεπάμη (0,05-0,10mg/kg) και ακολούθως με ενδοφλέβια φόρτιση με φαινυτοΐνη ή φοσφαινοτοΐνη (15-20mg/kg), βαλπροϊκό οξύ (15-45mg/kg) ή φαινοβαρβιτάλη 15-20mg/kg). Η προφυλακτική αντιεπιληπτική αγωγή είναι αμφιλεγόμενο θέμα σε ασθενείς με ΕΑ μιας και δεν υπάρχουν τυχαίοποιημένες μελέτες. Μερικά κέντρα χρησιμοποιούν προφυλακτική αγωγή σε ασθενείς με μεγάλα υπερσκηνιδιακά αιματώματα και χαμηλό επίπεδο συνείδησης με διακοπή ένα μήνα μετά το επεισόδιο αν δεν υπάρχουν επιληπτικές κρίσεις(91). Σε κωματώδεις ασθενείς θα πρέπει να γίνεται έλεγχος με ΗΕΓ για την αποκάλυψη επιληπτικών κρίσεων χωρίς κινητικά φαινόμενα (non-convulsive seizures) οι οποίες ανέρχονται σε ποσοστό έως 28% των ασθενών με ΕΑ που βρίσκονται σε κωματώδη κατάσταση. Θεραπευτικά χορηγείται μιδαζολάμη σε δόσεις 0,2mg/kg/h.

Πυρετός: Είναι πολύ συχνός ιδιαίτερα όταν υπάρχει ενδοκοιλιακή επέκταση της αιμορραγίας και πρέπει να αντιμετωπίζεται δραστικά. Η αυξημένη θερμοκρασία σχετίζεται με επιδείνωση της νευρωνικής βλάβης και χειρότερη πρόγνωση. Η

ενδοφλέβια παρακεταμόλη και τα ψυχρά επιθέματα μπορούν να βοηθήσουν στη ρύθμιση της θερμοκρασίας.

Θρέψη: Σε κωματώδεις ασθενείς η σίτιση θα πρέπει να ξεκινήσει μέσα σε 48 ώρες μετά την ΕΑ για να μειωθεί ο κίνδυνος υποθρεψίας. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση λεπτού ρινογαστρικού σωλήνα ο οποίος φαίνεται ότι μειώνει τον κίνδυνο εισρόφησης. Ακολουθώντας σε περίπτωση που ο ασθενείς δεν ανακτά το επίπεδο συνείδησης μπορεί να αντικατασταθεί με γαστροστομία.

Προφύλαξη από την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση: Οι ασθενείς με ΕΑ βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θρόμβωσης των εν τω βάθει φλεβών των άκρων και πνευμονικής εμβολής λόγω της πάρεσης των άκρων και της παρατεταμένης ακινησίας. Ελαστικές κάλτσες μπορούν να εφαρμοστούν με την εισαγωγή του ασθενούς. Η χρήση μικρών δόσεων (5.000UI) κλασσικής ηπαρίνης ή οι ηπαρίνες χαμηλού μοριακού βάρους από τη 2^η ημέρα της ΕΑ βρέθηκε ότι μειώνουν τον κίνδυνο θρομβώσεων χωρίς να αυξάνεται η ενδοκράνια αιμορραγία.

Πιεστικά φαινόμενα του αιματώματος και ενδοκράνια υπέρταση: Η πίεση της μάζας του αιματώματος και η μετάθεση των δομών της μέσης γραμμής είναι συνέπεια της αύξησης του όγκου του αιματώματος, του οίδηματώδους ιστού που περιβάλλει το αιμάτωμα και του αποφρακτικού υδροκεφάλου τα οποία αντισταθμίζονται από την αντίπλευρη πίεση του ΕΝΥ στις κοιλίες και τον υπαραχνοειδή χώρο. Είναι φανερό ότι μια γρήγορη αύξηση της πίεσης από μια μεγάλη ΕΑ δεν μπορεί να αντισταθμιστεί με αποτέλεσμα τον εγκολεασμό. Η ενδοκράνια πίεση θα πρέπει να μετράται σε κωματώδεις ασθενείς ή όταν υπάρχουν σημεία εγκολεασμού του στελέχους. Η χορήγηση ωσμωτικώς δρώντων φαρμάκων και ο υπεραερισμός αναστέλλουν το διασκηνιδιακό εγκολεασμό, βελτιώνουν την αιματική κυκλοφορία και το μεταβολισμό του εγκεφάλου(92) και κατ' επέκταση τη μακροχρόνια έκβαση(93). Τα κορτικοειδή θα πρέπει να αποφεύγονται γιατί τυχαιοποιημένες μελέτες δεν έδειξαν ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με ΕΑ(94, 95).

Ενδοκοιλιακή αιμορραγία και υδροκέφαλος: η παρουσία αίματος εντός των κοιλιών του εγκεφάλου σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα κυρίως λόγω ανάπτυξης αποφρακτικού υδροκεφάλου(96). Η τοποθέτηση ενδοκοιλιακού καθετήρα είναι σωτήρια γι' αυτούς τους ασθενείς αλλά υπάρχει αυξημένος κίνδυνος λοίμωξης. Μέσω του ενδοκοιλιακού καθετήρα μπορούν να χορηγηθούν διάφοροι θρομβολυτικοί παράγοντες για την ταχύτερη λύση του θρόμβου.

Αιμοστατική θεραπεία: Σε μια πρόσφατη μελέτη(97) βρέθηκε ότι η χορήγηση ανασυνδυασμένου παράγοντα VII μέσα σε 4 ώρες από την έναρξη της ΕΑ σχετίζεται με μείωση κατά 50% του όγκου του αιματώματος και με καλύτερη έκβαση. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια αύξηση κατά 5% των αρτηριακών θρομβοεμβολικών επεισοδίων.

Χειρουργική θεραπεία: Οι στόχοι της χειρουργικής εκκένωσης της ΕΑ είναι η μείωση της πίεσης της μάζας του αιματώματος στους παρακείμενους ιστούς και η προφύλαξη του φυσιολογικού εγκεφαλικού παρεγχύματος από την επίδραση διαφόρων νευροτοξικών παραγόντων που απελευθερώνονται στο σημείο της βλάβης. Παρ' όλα αυτά σε μελέτες βρέθηκε ότι δεν υπάρχει υπεροχή της χειρουργικής αντιμετώπισης των υπερσκληνιδιακών ΕΑ όσον αφορά την έκβαση των ασθενών σε σχέση με την συντηρητική αντιμετώπιση(98, 99). Υπάρχουν όμως ομάδες ασθενών με υπερσκληνιδιακή αιμορραγία που μπορούν να ωφεληθούν από την χειρουργική εκκένωση όπως μικρότερης ηλικίας άτομα με μεγάλες λοβώδεις αιμορραγίες και με γρήγορη επιδείνωση λόγω των πιεστικών φαινομένων του αιματώματος(100). Επίσης, νεότερες μελέτες υπογραμμίζουν την υπεροχή της στερεοτακτικής αναρρόφησης του αιματώματος σε σχέση με την ανοιχτή μέθοδο(101). Αναμφίβολα όμως, η χειρουργική θεραπεία είναι επιβεβλημένη σε περιπτώσεις ενδοπαρεγκεφαλιδικής αιμορραγίας με διάμετρο μεγαλύτερη από 3εκ και μάλιστα πριν την κλινική επιδείνωση του ασθενούς η οποία μπορεί να ταχεία και απρόβλεπτη(45).

Μελλοντικές κατευθύνσεις: Με την καλύτερη γνώση της παθοφυσιολογίας της ΕΑ υπάρχουν προοπτικές ανάπτυξης νέων θεραπειών με στόχο την μείωση του οιδήματος και της νευρωνικής βλάβης με τη χρήση αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών ουσιών και παραγόντων που δεσμεύουν επιβλαβείς ουσίες όπως η θρομβίνη και τα προϊόντα διάσπασης της αιμοσφαιρίνης. Επίσης θα πρέπει να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα της πρώιμης στερεοτακτικής χειρουργικής παρέμβασης και η τοπική χρήση θρομβολυτικών ή αιμοστατικών παραγόντων.

Παθοφυσιολογία των ΕΑ

Παθοφυσιολογία της βλάβης του αγγειακού τοιχώματος στην ΠΕΑ

Δύο κλινικά και παθολογοανατομικά ευδιάκριτες κλινικές οντότητες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση της ΠΕΑ. Η αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια και η υπερτασική αγγειοπάθεια του εγκεφάλου.

Αμυλοειδωσική Αγγειοπάθεια του Εγκεφάλου

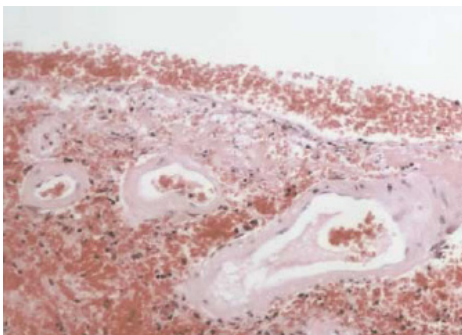
Η αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια (ΑΑ) του εγκεφάλου προκαλείται από την εναπόθεση αμυλοειδούς στα εγκεφαλικά αγγεία, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των αγγείων αυτών. Η ΑΑ είναι συνήθως ασυμπτωματική ή μπορεί να εκδηλωθεί με ΠΕΑ ή έκπτωση των νοητικών λειτουργιών. Η ακριβής συχνότητα της νόσου δεν είναι γνωστή για το λόγο ότι η βέβαιη διάγνωσή της τίθεται μόνο με βιοψία εγκεφάλου. Η παθολογοανατομική μελέτη εγκεφαλικών ιστών σε φυσιολογικό πληθυσμό φανερώνει μια επίπτωση από μέτρια σε σοβαρή μορφή ΑΑ της τάξεως του 2.3% για άτομα ηλικίας 65 έως 74 ετών, 8% για άτομα ηλικίας 75 έως 84 ετών και 12.1% για εκείνους ηλικίας 85 ετών και άνω(102). Η σύγκριση των ποσοστών αυτών με την ετήσια συχνότητα όλων των μορφών ΠΕΑ φανερώνει ότι μόνο μια μειοψηφία παθολογοανατομικά προχωρημένων περιστατικών ΑΑ καταλήγει ΠΕΑ.

Αν και η συχνότητα της αιμορραγίας είναι χαμηλή, οι αιμορραγίες που προκαλούνται από την ΑΑ είναι υπεύθυνες, σε μεγάλο ποσοστό, για τις ΠΕΑ που παρατηρούνται σε ηλικιωμένα άτομα. Νεκροτομές ασθενών με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και ηλικία μεγαλύτερη των 60 ετών φανερώνουν στατιστικά σημαντικά ποσοστά ΑΑ της τάξεως του 11-15%, ενώ σε άλλες μελέτες ανέρχονται μέχρι και 34%(103).

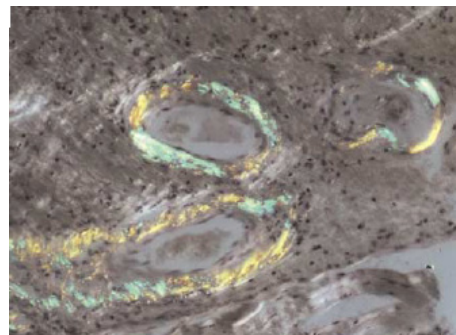
Όσον αφορά διάφορα επιδημιολογικά στοιχεία, η προχωρημένη ηλικία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση ΠΕΑ που οφείλεται σε ΑΑ, γεγονός που αποδεικνύεται από την εξάρτηση της ΑΑ από την ηλικία. Η ανάπτυξη ΠΕΑ λόγω ΑΑ δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο φύλων (49% άνδρες, 51% γυναίκες). Γενικά, η άνοια θεωρείται ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΠΕΑ λόγω σε ΑΑ. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη μιας στενής μοριακής συσχέτισης ανάμεσα στην ΑΑ και τη νόσο Alzheimer. Μια παθολογοανατομική μελέτη σε 117 εγκεφάλους ασθενών με νόσο Alzheimer απέδειξε ότι εμφάνιζαν προχωρημένη ΑΑ σε ποσοστό 25.6%, ενώ ΠΕΑ σε ποσοστό 5.1%(104). Η σχέση ανάμεσα στην ΑΑ και τη νόσο Alzheimer οφείλεται εν μέρει σε κοινό γενετικό παράγοντα κινδύνου, την απολιποπρωτεΐ-

νη E (APOE-ε4). Ωστόσο, η APOE εμπλέκεται με διαφορετικό παθοφυσιολογικό μηχανισμό στα δύο νοσήματα.

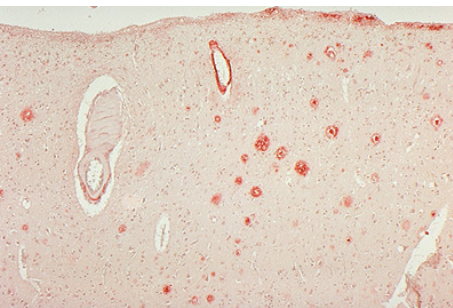
Αν και η υπέρταση παίζει σημαντικό ρόλο στη νέκρωση και ρήξη των εν τω βάθει διαπιτραινόντων αγγείων, φαίνεται πως δεν έχει παρόμοια λειτουργία στην ΠΕΑ που οφείλεται σε ΑΑ. Η επίπτωση της υπέρτασης στην ΑΑ κυμαίνεται από 32-52%, ποσοστά που δεν διαφέρουν από το ποσοστό υπέρτασης στον γενικό πληθυσμό των ηλικιωμένων ατόμων(11). Μελέτες σε ηλικιωμένα άτομα φανερώνουν ότι η υπέρταση είναι λιγότερο συχνή στη λοβώδη ΠΕΑ απ' ότι στην αιμορραγία των βασικών γαγγλίων, της παρεγκεφαλίδας, ή της γέφυρας(105). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με παθολογοανατομικές αναλύσεις που δε φανερώνουν καμιά σχέση ανάμεσα στην υπέρταση και την ΠΕΑ λόγω ΑΑ. Ανάμεσα σε άλλους αγγειακούς παράγοντες, η συχνότητα συνύπαρξης διαβήτη, υπερλιπιδαιμίας και στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης δεν είναι αυξημένη στην ΑΑ.



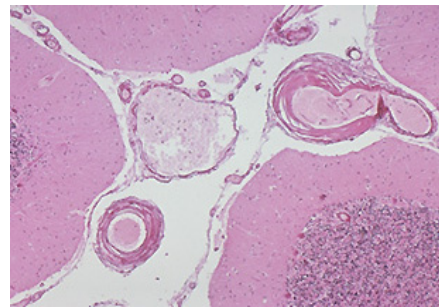
Ευρήματα ΑΑ εγκεφάλου:
ακυτταρικό εωσινοφιλικό υλικό στο
τοιχώμα των αγγείων (hematoxylin
and eosin x100)



Ευρήματα ΑΑ εγκεφάλου: πράσινη
απόχρωση στο τοίχωμα των
αγγείων (Congo red x100)



Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση
γεροντικών πλακών και ΑΑ
εγκεφάλου με ειδικό anti-Aβ
αντίσωμα



Δημιουργία μικροανευρύσματος σε
ασθενή με ΑΑ εγκεφάλου

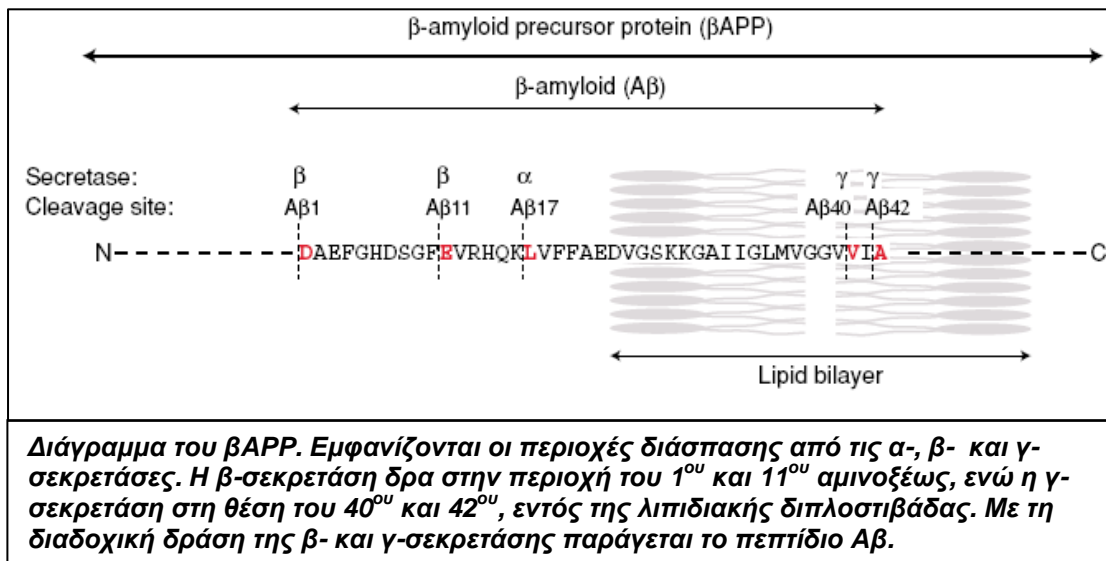
Η ΑΑ μπορεί να ανιχνευθεί σε παθολογοανατομικά παρασκευάσματα με χρώσεις αιματοξυλίνης-εωσίνης ως εξάλειψη των λείων μυϊκών ινών στα τοιχώματα των εγκεφαλικών αγγείων ή με κυτταροχημικές χρώσεις και μικροσκόπηση σε πολωμένο φως. Τελευταία έχουν αναπτυχθεί διάφορες ανοσοϊστοχημικές με τη χρήση διαφόρων ειδικών αντισωμάτων έναντι του αμυλοειδούς.

Παθολογοανατομικές αναλύσεις φανερώνουν ότι η ΑΑ είναι ένας συνδυασμός εναπόθεσης αμυλοειδούς και διάσπασης του τοιχώματος των αγγείων. Τα αγγεία που προσβάλλονται είναι τα τριχοειδή, τα αρτηρίδια, και οι μικρού ή μεσαίου μεγέθους αρτηρίες που βρίσκονται κυρίως στον εγκεφαλικό φλοιό, τις υπερκείμενες λεπτομήνιγγες και την παρεγκεφαλίδα. Αντιθέτως, δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες βλάβες στα αγγεία της λευκής και της εν τω βάθει φαιάς ουσίας. Αυτό εξηγεί και την εντόπιση της ΕΑ λόγω ΑΑ στους λοβούς και λιγότερο συχνά στην παρεγκεφαλίδα και τη συχνή επέκταση στις κοιλίες και στον υπαραχνοειδή χώρο για το λόγο ότι η ΑΑ είναι μια μικροαγγειοπάθεια που κυρίως προσβάλλει το νεοφλοιό και τις υπερκείμενες λεπτομήνιγγες.

Η κατανομή της ΑΑ είναι κατά κανόνα ανομοιόμορφη και τμηματική, οπότε τμήματα αγγείων με σοβαρές βλάβες μπορεί να βρίσκονται δίπλα σε περιοχές χωρίς εναποθέσεις αμυλοειδούς (106). Το υλικό συσσωρεύεται στα όρια του μέσου και εξωτερικού χιτώνα των αγγείων, ενώ σε βαρύτερες μορφές επεκτείνεται και αντικαθιστά ολόκληρο το μυϊκό χιτώνα των αγγείων. Αυτές οι παθολογικές αλλοιώσεις συνεπάγονται το σχηματισμό μικροανευρυσμάτων, τον ομόκεντρο διαχωρισμό του τοιχώματος του αγγείου, τη χρόνια περιαγγειακή ή διατοιχωματική φλεγμονώδη αντίδραση και την ινδοειδή νέκρωση (105). Επίσης, οι βλάβες αυτές συχνά συνοδεύονται με περιαγγειακές εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης και ερυθρών αιμοσφαιρίων ενδεικτικές συνεχιζόμενης διαρροής αίματος. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαπιστώνεται καταστροφή των λείων μυϊκών ινών των προσβαλλόμενων αγγείων και εναπόθεση των χαρακτηριστικών 7-10nm ινιδίων αμυλοειδούς. Ενδιαφέρον είναι ότι το ενδοθήλιο παραμένει φυσιολογικό αν και σε σοβαρή αγγειοπάθεια μπορεί να παρουσιάσει ρωγμές.

Το κυριότερο συστατικό του αμυλοειδούς στα αγγεία κατά την ανάπτυξη ΑΑ είναι το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς (Αβ) το οποίο ανευρίσκεται και στις γεροντικές πλάκες στη νόσο Alzheimer. Το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς περιέχει 39-43 αμινοξέα και αποτελείται από τρεις περιοχές: ένα υδρόφιλο N-τελικό άκρο (aa1-16), ένα κεντρικό, υδρόφοβο τμήμα (aa17-21) και ένα μακρύ, υδρόφοβο C-τελικό άκρο (aa29-43). Το Αβ πεπτιδίο προέρχεται από την πρωτεολυτική διάσπαση του προδρόμου μορίου του β-αμυλοειδούς (APP). Οι πιο γνωστές ισομορφές του APP αποτελούνται από 695-770

αμινοξέα και προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα (splicing). Αρχικά, το πρόδρομο μόριο του β-αμυλοειδούς διασπάται από τη β-σεκρετάση (b-secretase) στο N-τελικό άκρο του Αβ πεπτιδίου, δημιουργώντας ένα εξωκυττάριο παράγωγο (sAPP) και ένα C – τελικό APP μόριο που προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη (CTFb). Η δεύτερη διάσπαση του CTFb από τη γ-σεκρετάση (g-secretase) καταλήγει στην παραγωγή Αβ πεπτιδίων ποικίλου μεγέθους.



Τα Αβ πεπτιδία που αποτελούνται από 42 (Αβ42) ή 43 (Αβ43) αμινοξέα είναι υπεύθυνα για τη συσσώρευση του αμυλοειδούς τόσο στα αγγεία όσο και τις γεροντικές πλάκες(107). Ωστόσο, στα τμήματα των αγγείων με σοβαρές βλάβες κυριαρχεί η Αβ40 ισομορφή. Ένας αριθμός άλλων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών τμημάτων αποτελούν συστατικά του αμυλοειδούς των αγγείων, αν και δεν είναι γνωστός ο παθογενετικός ρόλος τους στις βλάβες του τοιχώματος των αγγείων. Τέτοια συστατικά είναι η απολιποπρωτεΐνη Ε, η κυστατίνη C (cystatin C), η α-συνουκλεΐνη (alpha-synuclein), η α1-αντιχυμοθρυψίνη και πολλές πρωτεΐνες του συμπληρώματος.

Τα ε2 και ε4 αλληλόμορφα της ΑΡΟΕ αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την ΠΕΑ που οφείλεται σε ΑΑ. Μελέτες φανερώνουν ότι δρουν κατά την εναπόθεση Αβ αμυλοειδούς και τη διάσπαση του τοιχώματος των αγγείων, προκαλώντας αιμορραγία. Πιο ειδικά, η ε4 ισομορφή σχετίζεται θετικά με μια δοσοεξαρτώμενη αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδούς στα αγγεία και στις γεροντικές πλάκες (108). Απ' την άλλη πλευρά, η ε2 ισομορφή είναι υπεύθυνη για τις βλάβες των αγγείων στην ΑΑ, όπως τον ομόκεντρο διαχωρισμό του τοιχώματος των αγγείων και την ινδοειδή νέκρωση (109).

Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης της ε2 ισομορφής στη διάσπαση του αγγειακού τοιχώματος δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Η μελέτη της δράσης του Αβ πεπτιδίου σε συστατικά αγγείων *in vitro* βοηθά στη διαλεύκανση των παθολογοανατομικών μηχανισμών της ΑΑ. Φαίνεται ότι το πεπτίδιο του β- αμυλοειδούς έχει τοξική δράση σε μια ποικιλία αγγειακών κύτταρων *in vitro*, όπως τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μια άλλη ιδιότητα του Αβ πεπτιδίου που παρατηρείται *in vitro* είναι η διέγερση της t-PA πρωτεΐνης (tissue-type plasminogen activator), γεγονός που επιβεβαιώνει την πιθανότητα η ΑΑ να προκαλεί ΠΕΑ.

Η παθογένεση της ΑΑ μελετήθηκε και σε μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών. Η ΑΑ εμφανίζεται σε σειρές ποντικών που βρίσκονται σε προχωρημένη ηλικία και παράγουν αυξημένα επίπεδα μεταλλαγμένης APP(110). Η παράλληλη έκφραση του προδρόμου APP μορίου και του μεταγραφικού παράγοντα TGF-1 (cytokine transforming growth factor-β1) προκαλεί την ανάπτυξη μιας πιο ραγδαίας και σοβαρής ΑΑ. Ταυτόχρονα, φαίνεται ότι η έκφραση του TGF-1 συμβάλλει στη μειωμένη εναπόθεση αμυλοειδούς στις γεροντικές πλάκες. Πιθανόν, λοιπόν, η φλεγμονώδης αντίδραση να έχει αντίθετα αποτελέσματα στη συσσώρευση αμυλοειδούς στο τοίχωμα των αγγείων απ' ότι στις γεροντικές πλάκες(111).

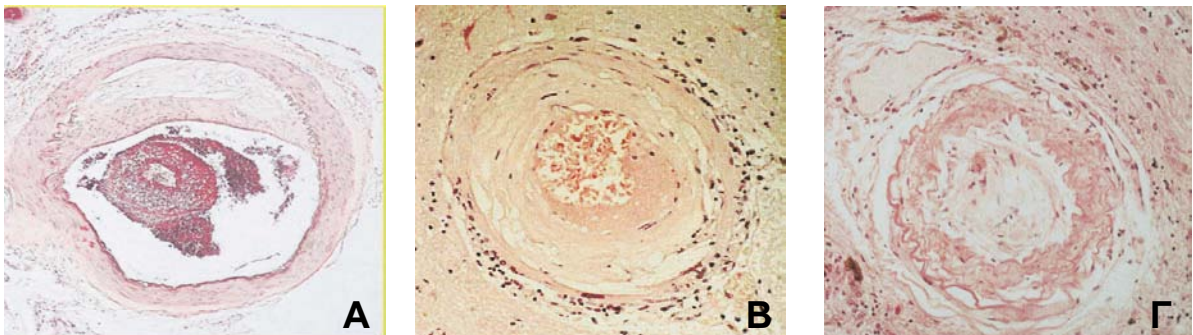
Οι μελέτες στα διαγονιδιακά ποντίκια φανερώνουν, επίσης, ότι το πεπτίδιο του β-αμυλοειδούς πιθανόν να δρα στη φυσιολογία του αγγείου. Τμήματα αγγείων που περιείχαν ακόμα και ήπιες ποσότητες αμυλοειδούς ήταν πιο διευρυμένα από άλλα τμήματα των ίδιων αγγείων. Σε άλλη σειρά αναλύσεων παρατηρήθηκαν περιορισμένες απαντήσεις των εγκεφαλικών αγγείων σε αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι ακόμα και η ήπια ή μέτρια μορφή ΑΑ πιθανόν να προκαλεί κλινικά σημαντική δυσλειτουργία της ροής του αίματος στον εγκεφαλικό ιστό(112).

Υπερτασική αγγειοπάθεια του Εγκεφάλου

Η φύση της υπερτασικής αρτηριακής βλάβης που οδηγεί σε ρήξη του αγγείου δεν είναι πλήρως γνωστή, αλλά σε μερικές μελέτες που έχει διενεργηθεί σειρά τομών, η αιμορραγία φαίνεται να προέρχεται από ένα αλλοιωμένο λόγω της υπέρτασης τμήμα του αρτηριακού τοιχώματος. Η χρόνια επίδραση της υπέρτασης στην εγκεφαλική μικροκυκλοφορία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αλλοιώσεων που περιλαμβάνουν την υπερπλαστική αρτηριοσκλήρυνση, την ινιδοειδή νέκρωση, τη λιποϋαλίνωση και τη

μικροαθηρωμάτωση(10). Η υπερπλαστική αρτηριοσκλήρυνση είναι τυπική της σοβαρής χρόνιας υπέρτασης και χαρακτηρίζεται από υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών στο τοίχωμα των αγγείων, με συγκεντρική (σαν κρεμμύδι) πεταλοειδή πάχυνση των τοιχωμάτων και στένωση του αυλού. Ινδοειδής νέκρωση των αγγείων εμφανίζεται σε υπερτασικές αιχμές και χαρακτηρίζεται από τμηματική στένωση, διαστολή και νέκρωση του τοιχώματος του αγγείου με εναπόθεση μιας εωσινοφιλικής ουσίας. Γύρω από τα εκφυλισμένα υπολείμματα, οι περιαγγειακοί και νευρικοί ιστοί καταστρέφονται και εμφανίζεται οίδημα και διήθηση αστροκυττάρων.

Στους υπερτασικούς ασθενείς, οι μικρές εστίες μικροαθηρωμάτωσης (100-400μm) προκαλούν στένωση και απόφραξη των αρτηριολίων. Η λιποϋαλίνωση είναι μια προοδευτική αποδιοργάνωση του τοιχώματος των μικρών αρτηριών, που συνήθως εμφανίζεται σε αγγεία διαμέτρου μικρότερης των 200μm, με εναπόθεση μιας υαλίνης ινωδοειδούς ουσίας στον έσω χιτώνα των αρτηριών. Η λιποϋαλίνωση οδηγεί είτε σε θρομβωτική απόφραξη του αυλού και σε κενотоπιώδες έμφρακτο είτε σε καταστροφή του τοιχώματος με σχηματισμό μικροανευρυσμάτων και υπερτασική ΕΑ.

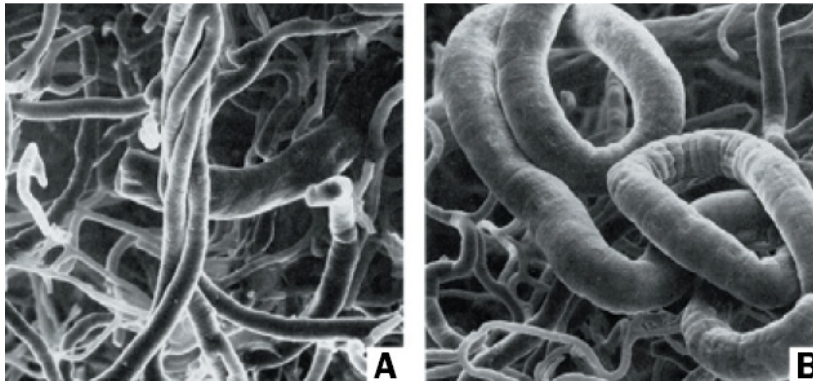


Δημιουργία μικροαθηρώματος (Α), συγκεντρικής υπερπλαστικής αρτηριοσκλήρυνσης (Β), και λιποϋαλίνωσης (Γ) σε διατρηαινόντες κλάδους εγκεφαλικών αγγείων.

Σκλήρυνση και απώλεια της ελαστικότητας διατρηαινόντων κλάδων εγκεφαλικών αγγείων ως αποτέλεσμα χρόνιας υπέρτασης



Άλλες αλλοιώσεις των αγγείων εξαιτίας της υπέρτασης είναι η αύξηση του μήκους τους, η παραμόρφωση και η ελικοειδής τους πορεία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ροής του αίματος σε αυτά τα αγγεία.



Επιμήκυνση (A) και ελίκωση (B) των εγκεφαλικών αρτηριδίων ως αποτέλεσμα χρόνιας υπέρτασης

Η βλάβη του αρτηριακού τοιχώματος από υπέρταση (τμηματική λιποϋαλίνωση, ινδοειδής νέκρωση και μικροανεύρυσμα τύπου Charcot-Bouchard) οδηγεί τελικά σε ρήξη του αγγείου και αιμορραγία. Σε διάφορες μελέτες έχει επιβεβαιωθεί η σχέση αυτών των ανευρυσμάτων με την υπέρταση και την υπερτασική αιμορραγία, καθώς και η συχνή εντόπιση στις διατητραίνουσες μικρές αρτηρίες και στα αρτηρίδια των βασικών γαγγλίων, του θαλάμου, της γέφυρας, της παρεγκεφαλίδας και της υποφλοιώδους λευκής ουσίας. Παρόλα αυτά σε λίγες αιμορραγίες που έχουν εξετασθεί με σειρά τομών, η αιμορραγία δεν ήταν δυνατό να συσχετισθεί με ανευρύσματα τύπου Charcot-Bouchard. Μελέτες επίσης σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο απεκάλυψαν πολλαπλές διασχίσεις του ελαστικού υμένα, σχεδόν πάντα στις διακλαδώσεις των μικρών αγγείων. Πιθανότατα αυτές οι βλάβες αποτελούν περιοχές δευτερεύουσας ρήξης λόγω διάσχισης από το επεκτεινόμενο αιμάτωμα. Ωστόσο τέτοιου τύπου αλλοιώσεις έχουν παρατηρηθεί και σε υγιή αγγεία.

Εξέλιξη του αιματώματος

Η ρήξη των εγκεφαλικών αγγείων οδηγεί σε αιμορραγία εντός του εγκεφαλικού ιστού, ενώ επέκταση της αιμορραγίας στο κοιλιακό σύστημα ή τον υπαραχνοειδή χώρο είναι σπάνια. Το εξαγγειωμένο αίμα σχηματίζει μια σχεδόν κυκλική ή ελλειπτική μάζα, η οποία διασχίζει τον εγκεφαλικό ιστό και αναπτύσσεται σε όγκο καθώς συνεχίζεται η

αιμορραγία. Το παρακείμενο παρέγχυμα παραμορφώνεται και συμπιέζεται με αποτέλεσμα να ισχαιμεί, ενώ μερικές φορές δημιουργούνται πετεχειώδεις αιμορραγίες που προκαλούνται από τη ρήξη αρτηριδίων ή φλεβιδίων. Στην περιφέρεια του αιματώματος μετά από ένα χρονικό διάστημα ωρών ή ημερών, αναπτύσσεται εξωκυττάριο οίδημα. Το μέγεθος και η εντόπιση του αιματώματος, αλλά και ο βαθμός του οιδήματος καθορίζουν τη χωροκατακτητική συμπεριφορά της ΕΑ. Σε μεγάλα αιματώματα μπορεί να παρατηρηθεί μετάθεση των δομών της μέσης γραμμής ή πίεση του στελέχους και του δικτυωτού σχηματισμού.

Το αίμα που έχει εξαγγειωθεί υφίσταται μια σειρά από αναμενόμενες μεταβολές. Μετά από διάστημα 4-10 ημερών, αρχίζει η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η μετατροπή τους σε μια άμορφη μάζα μεθαιμοσφαιρίνης. Από τη 2η ημέρα, στην περιφέρεια του αιματώματος εμφανίζονται πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα τα οποία παρουσιάζουν μέγιστο αριθμό την 4η ημέρα. Ακολουθεί η διήθηση των μικρογλοιακών κυττάρων, τα οποία δρουν ως μακροφάγα, μεταβολίζοντας άχρηστα κυτταρικά συστατικά, όπως προϊόντα διάσπασης της μυελίνης και χρωστικές του αίματος, κυρίως αιμοσιδηρίνη. Το τελικό στάδιο της διαδικασίας αυτής είναι ο πολλαπλασιασμός των αστροκυττάρων από την περιφέρεια του αιματώματος. Σε χρόνια φάση, τα αστροκύτταρα αντικαθίστανται από νευρογλοιακά ινίδια(113).

Πρωτοπαθής και δευτεροπαθής βλάβη του εγκεφαλικού παρεγχύματος

Η πρωτοπαθής βλάβη του εγκεφαλικού παρεγχύματος μετά από ΕΑ οφείλεται στην κάκωση και διάσχιση του εγκεφαλικού ιστού και είναι ανάλογη με τον όγκο του αιματώματος. Γύρω από το αιμάτωμα αναπτύσσεται σχεδόν αμέσως οίδημα το οποίο μεγιστοποιείται 10-20 ημέρες μετά. Αρχικά το οίδημα είναι αγγειοκινητικό ενώ στη συνέχεια κυτταροτοξικό. Με την αύξηση του όγκου του αιματώματος η ροή του αίματος στην περιοχή πέριξ του αιματώματος μπορεί να μειωθεί σημαντικά, με αποτέλεσμα την ισχαιμική βλάβη του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Επιπλέον, το εγκεφαλικό οίδημα αυξάνει την ενδοκράνιο πίεση το οποίο οδηγεί σε μειωμένη πίεση αιμάτωσης.

Μια σειρά όμως δευτεροπαθών μηχανισμών κινητοποιούνται αμέσως μετά την ΕΑ στην περιοχή γύρω από το αιμάτωμα, με αποτέλεσμα η συνολική βλάβη του εγκεφαλικού παρεγχύματος να είναι πολύ μεγαλύτερη από την πρωτοπαθή. Οι δευτεροπαθείς αυτοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν: α) την επαγωγή πρωτεασών, όπως θρομβίνη, ινωδογόνο, t-PA (tissue plasminogen activator), β) την ενεργοποίηση

παραγόντων πήξης που σχετίζονται με προϊόντα διάσπασης του αίματος, γ) την ενεργοποίηση φλεγμονώδους αντίδρασης στο σημείο της βλάβης, η οποία οφείλεται στην απελευθέρωση κυτταροτοξικών, κυτταρικών και χυμικών παραγόντων και την εξαγγείωση πρωτεϊνών και οσμωτικά ενεργών ηλεκτρολυτών.

Μελέτες τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματικά μοντέλα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την έκταση και την προοδευτική επιδείνωση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΕΑ. Για την έρευνα της ΕΑ σε πειραματικά μοντέλα έχουν μελετηθεί διάφορα είδη ζώων. Γενικά, η εγκεφαλική βλάβη μετά από ΕΑ εκδηλώνεται τόσο στη φαιά όσο και στη λευκή ουσία. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται πειραματόζωα τα οποία έχουν παρόμοιες με τον άνθρωπο αναλογίες φαιάς και λευκής ουσίας.

Θρομβίνη

Η θρομβίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης, που καταλύει τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινική και παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος. Παράγεται στον εγκεφαλικό ιστό αμέσως μετά από ΕΑ. Έχει βρεθεί ότι η έκχυση μεγάλων δόσεων θρομβίνης στον εγκέφαλο πειραματικών μοντέλων προκαλεί τη διείσδυση φλεγμονωδών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μεσεγχύματος, τον σχηματισμό ουλής, τη δημιουργία εγκεφαλικού οιδήματος, μέσω της διάσπασης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, και την εκδήλωση επιληπτικών σπασμών(114). Επίσης, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων θρομβίνης προκαλεί την απόπτωση των νευρώνων και των αστροκυττάρων in vitro. Μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι η θρομβίνη προκαλεί την εμφάνιση πρώιμης βλάβης μετά από ΕΑ(114).

Η τοξική δράση της θρομβίνης φαίνεται επίσης από το γεγονός ότι η χορήγηση ηπαρινισμένου αυτόλογου αίματος ενδοεγκεφαλικά δεν προκαλεί τη δημιουργία οιδήματος στην περιοχή πέριξ του αιματώματος εντός 24h σε αρουραίους και χοίρους(115). Επίσης, σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη σε μοντέλα ΕΑ βρέθηκε ότι η συστηματική χορήγηση ενός αναστολέα της θρομβίνης (argatroban) προκαλεί μείωση του εγκεφαλικού οιδήματος στην περιοχή πέριξ του αιματώματος(116). Η συγκεκριμένη φαρμακευτική αγωγή δεν χορηγήθηκε το πρώτο 24ωρο μετά την ΕΑ για την αποφυγή επανεμφάνισης αιμορραγίας.

Ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοσφαιρίνη και σίδηρος

Η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων που σχετίζεται με την απορρόφηση του αιματώματος παρατηρείται αρκετές ημέρες μετά την εμφάνιση ΕΑ σε αρουραίους, σκυλιά, καθώς και στον άνθρωπο(117). Στον άνθρωπο, μελέτες έχουν δείξει ότι το

καθυστερημένο εγκεφαλικό οίδημα μετά από ΕΑ σχετίζεται με τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων(65).

Έχει βρεθεί ότι έκχυση συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων ενδοεγκεφαλικά σε αρουραίους, προκαλεί τη δημιουργία οιδήματος και την εμφάνιση σοβαρών λειτουργικών ελλειμμάτων αρκετές ημέρες μετά τη χορήγηση. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια πιθανό να σχετίζονται με την καθυστερημένη εγκεφαλική βλάβη(117). Αντιθέτως η έκχυση ερυθροκυττάρων, που έχουν υποστεί λύση, στα βασικά γάγγλια πειραματοζώων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία σοβαρού εγκεφαλικού οιδήματος και τη νευρωνική βλάβη εντός 24h μετά τη χορήγηση. Το γεγονός αυτό φανερώνει την τοξικότητα των προϊόντων λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων(117). Επιπλέον, έκχυση προϊόντων λύσης του αίματος στο φλοιού του εγκεφάλου επάγει τη νευρωνική έκφραση μιας πρωτεΐνης θερμικού σοκ (heatshock protein 70), η οποία αποτελεί δείκτη κυτταρικού stress.

Υπάρχουν επίσης μελέτες κατά τις οποίες ενδοεγκεφαλική έκχυση αιμοσφαιρίνης, αίμης ή σιδήρου επιδεινώνει το οίδημα και την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης, ενώ αναστολή της διάσπασης της αιμοσφαιρίνης ή χορήγηση χηλικών ενώσεων που δεσμεύουν το σίδηρο σχετίζονται με μικρότερο βαθμό εγκεφαλικής κάκωσης. Τα ευρήματα αυτά φανερώνουν ότι η αιμοσφαιρίνη καθώς και τα προϊόντα διάσπασής της είναι τοξικά και συμβάλλουν στην εμφάνιση εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΕΑ(118).

Φλεγμονή

Έχει βρεθεί ότι η φλεγμονώδης αντίδραση επιδεινώνει την εγκεφαλική βλάβη μετά από ΕΑ. Μελέτες σε εγκεφάλους ανθρώπων και πειραματικών μοντέλων δείχνουν ότι η φλεγμονώδης αντίδραση επάγεται αμέσως μετά την ΕΑ και κορυφώνεται αρκετές ημέρες αργότερα(119). Διείσδυση πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων παρατηρείται εντός 2 ημερών μετά από ΕΑ σε αρουραίους, ενώ για περίπου 1 μήνα παραμένουν στην περιοχή της βλάβης ενεργοποιημένα κύτταρα μικρογλοίας. Χορήγηση μιας ουσίας (tuftsin fragment 1-3) που αναστέλλει την ενεργοποιημένη μικρογλοία σχετίζεται με μικρότερο βαθμό εγκεφαλικής βλάβης και οιδήματος μετά από ΕΑ(120). Επίσης, υψηλές συγκεντρώσεις προ-φλεγμονωδών μορίων στο ανθρώπινο πλάσμα (IL-1, IL-6, TNF- α , και ICAM-1) εντός 24ώρου μετά την έναρξη της ΕΑ σχετίζονται με το μέγεθος του οιδήματος στην περιοχή πέριξ του αιματώματος(121).

Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες της θεμέλιας ουσίας είναι μια κατηγορία ενζύμων, η παραγωγή των οποίων σχετίζονται με την έκταση της φλεγμονής μετά από ΕΑ. Οι ουσίες αυτές ενεργοποιούνται μετά από ΕΑ και προκαλούν τη διάσπαση του

αιματοεγκεφαλικού φραγμού και την εμφάνιση δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης. Επίσης, επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, προκαλώντας αποκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους με αποτέλεσμα την απώλεια μεταγωγής σήματος μέσω της ιντεγκρίνης. Η επιβλαβής δράση τους μειώνεται με τη χορήγηση ενός ενδογενούς αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών(122).

Επίσης, το συμπλήρωμα, που αποτελεί κύριο συστατικό της φλεγμονώδους αντίδρασης, εμπλέκεται στη δευτεροπαθή εγκεφαλική βλάβη μετά από ΕΑ. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτρέπει την είσοδο του συμπληρώματος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Ωστόσο, η πρωτεΐνη του συμπληρώματος μπορεί να εισέλθει στο εγκεφαλικό παρέγχυμα μετά από ΕΑ είτε ως συστατικό του εξαγγειωμένου αίματος ή λόγω διάσπασης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η εγκεφαλική βλάβη που σχετίζεται με το συμπλήρωμα πιθανό να προέρχεται από το σχηματισμό του συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη λύση των ερυθροκυττάρων στο εσωτερικό του αιματώματος, όπως επίσης και τη λύση των νευρώνων, της γλοίας, των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έχει δειχθεί ότι η αναστολή της φλεγμονώδους αντίδρασης μέσω αναστολέων του συμπληρώματος μειώνει το εγκεφαλικό οίδημα μετά από πειραματική ΕΑ(123).

Από τα προαναφερθέντα παθοφυσιολογικά στοιχεία σχετικά με την δευτεροπαθή εγκεφαλική βλάβη λόγω ΕΑ, προκύπτει ότι ο σίδηρος, η φλεγμονή και η θρομβίνη αποτελούν σημαντικούς στόχους για περαιτέρω θεραπευτικό σχεδιασμό. Ωστόσο, υπάρχουν δυσκολίες όσον αφορά τη δόσολογία, την οδό και το χρόνο χορήγησης και τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Για παράδειγμα η θρομβίνη, εμπλέκεται τόσο στη δευτεροπαθή βλάβη που επάγεται μετά από ΕΑ, όσο και στην αναστολή της αύξησης του όγκου του αιματώματος. Έτσι, θα πρέπει να προσδιοριστεί το ακριβές θεραπευτικό παράθυρο, μέσα στο οποίο παύει η ανάπτυξη του αιματώματος, και υπάρχει ένδειξη για τη χορήγηση αναστολέων της θρομβίνης.

Γενετική των ΠΕΑ

Οικογενείς μορφές ΠΕΑ

Αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια

Πολλές μορφές οικογενούς ΠΕΑ έχουν αναγνωρισθεί και ταυτοποιηθεί με τη βοήθεια γενετικών μελετών και οφείλονται σε αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια (AA) του εγκεφάλου. Στην AA το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς ή διάφορες άλλες πρωτεΐνες συσσωρεύονται στα αγγεία του εγκεφάλου και των λεπτομηνίγγων, προκαλώντας τη δυσλειτουργία τους. Η εναπόθεση κάθε παθολογικής πρωτεΐνης προκαλεί και διαφορετική αντίδραση στα τοιχώματα των αγγείων με αποτέλεσμα η κλινική εικόνα των διαφόρων οικογενών AA να ποικίλει από μετάλλαξη σε μετάλλαξη.

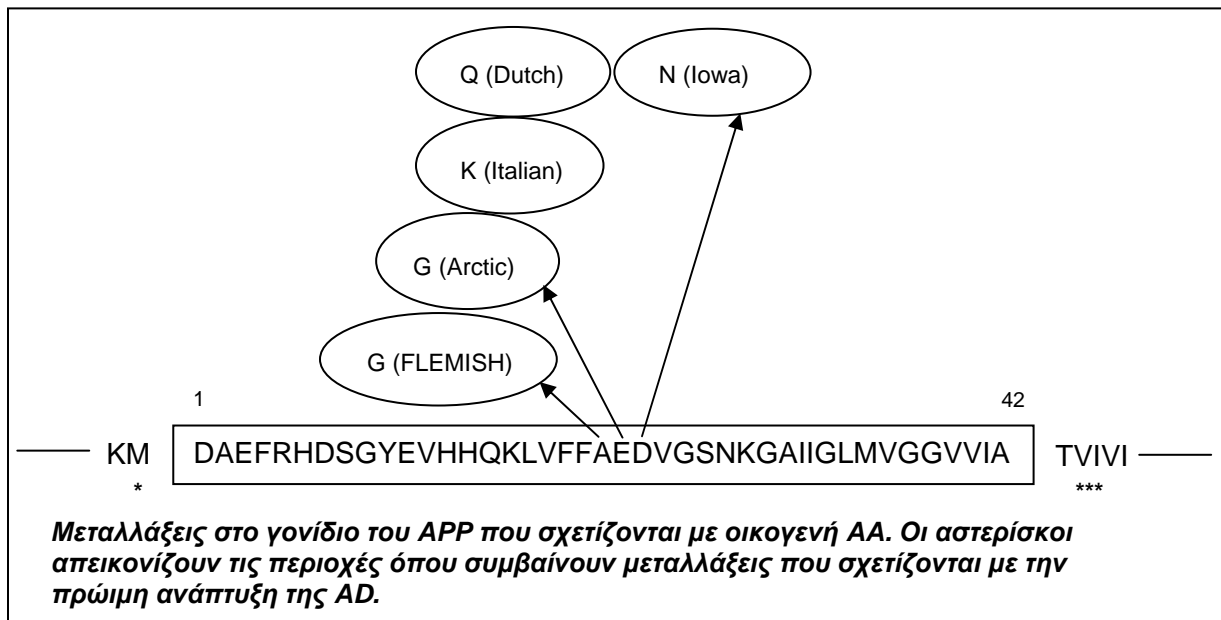
Οικογενής AA είχε αρχικά περιγραφεί σε Ισλανδούς ασθενείς στους οποίους ανιχνεύτηκε αντικατάσταση της γλουταμίνης από λευκίνη στη θέση 68 (L68Q) της αλληλουχίας που κωδικοποιεί τον αναστολέα πρωτεασών, κυστατίνη C (cystatin C). Η συγκεκριμένη AA χαρακτηρίζεται από πρόωμη εναπόθεση του μεταλλαγμένου τμήματος της πρωτεΐνης στα τοιχώματα των αγγείων και εμφάνιση EA την τρίτη ή τέταρτη δεκαετία της ζωής των ασθενών(124, 125).

Οικογενής άνοια έχει επίσης περιγραφεί σε μεγάλη οικογένεια από τη Βρετανία με περισσότερα από 200 μέλη και η οποία οφείλεται σε μετάλλαξη στο BRI γονίδιο (126). Η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία είναι λιγότερο εμφανής σε αυτούς τους ασθενείς. Στο συγκεκριμένο νόσημα παρατηρείται εναπόθεση ενός αδιάλυτου πεπτιδίου (ABri) με MB 4 kDa (34 αμινοξέα), το οποίο διασπάται από μια διαμεμβρανική πρόδρομη πρωτεΐνη. Η απλή αντικατάσταση μιας βάσης στο κωδικόνιο λήξης του BRI γονιδίου επάγει τη δημιουργία μεγαλύτερου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, το οποίο περιέχει 33 επιπλέον νουκλεοτίδια και καταλήγει στην έκφραση ενός παθολογικού πρόδρομου μορίου με 277 αμινοξέα. Η αδυναμία έκφρασης του φυσιολογικού καταλοίπου που αποτελείται από 266 αμινοξέα προκαλεί την εμφάνιση άνοιας και αταξίας και περιστασιακά EA (127).

Μια άλλη μορφή οικογενούς AA σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της διαθυρετίνης (transthyretin gene). Είναι πιθανό οι μεταλλάξεις αυτές να επηρεάσουν το ΚΝΣ, με αποτέλεσμα να προκαλείται λεπτομηνιγγική και υποεπενδυματική εναπόθεση, και να επάγεται η εκδήλωση υπαραχνοειδούς αιμορραγίας, ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας, επιληπτικών κρίσεων, υδροκέφαλου, νοητικής έκπτωσης και αταξίας (128-132).

Επίσης, έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις στα γονίδια της πρεσενιλίνης 1 και 2 (presenilin genes) σε ασθενείς με οικογενή άνοια, που οφείλεται σε διαταραχή της επεξεργασίας του προδρόμου μορίου του β-αμυλοειδούς (APP). Έχει δημοσιευθεί ένα γενεαλογικό δέντρο οικογένειας με μετάλλαξη στο γονίδιο της πρεσενιλίνης 2, όπου οι ασθενείς εμφανίζουν σοβαρή ΑΑ, ενώ ένα τουλάχιστον μέλος της οικογένειας εκδήλωσε αιμορραγικό ΑΕΕ (133). Ωστόσο, ΕΑ δεν έχει περιγραφεί σε οικογένειες με μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρεσενιλίνης 1 (134).

Η άλλη κύρια μορφή ΑΑ προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο του προδρόμου μορίου του β-αμυλοειδούς (APP). Το Αβ πεπτιδίο, το οποίο αποτελεί το κυριότερο συστατικό του αμυλοειδούς στα αγγεία κατά την ανάπτυξη ΑΑ, προέρχεται από την πρωτεολυτική διάσπαση του APP. Οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ΑΑ συμβαίνουν εντός της αλληλουχίας του APP.



Αντίθετα, οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ΑΔ συμβαίνουν εκτός της παραπάνω αλληλουχίας. Η κληρονομική ΑΑ που παρατηρείται σε Ολλανδούς ασθενείς προκαλείται από την αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από γλουταμίνη στη θέση 22 του πεπτιδίου του β-αμυλοειδούς (135). Η νόσος αυτή έχει τα τυπικά χαρακτηριστικά της επαναλαμβανόμενης, λοβιακής ΙCH. Μια παρόμοια κλινική εικόνα παρατηρείται σε Ιταλούς ασθενείς και προκαλείται από την αντικατάσταση της λυσίνης στη θέση αυτή (136). Άλλες μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ΑΑ προκαλούνται από την αντικατάσταση της γλυκίνης στη θέση 21 (137) του πεπτιδίου του β-αμυλοειδούς και την αντικατάσταση της ασπαραγίνης από ασπαρτικό οξύ στη θέση 23 (138).

ΕΑ σε Οικογενείς ΑΑ	Χρωμόσωμα	Γονίδιο	Μετάλλαξη	Όνομα μετάλλαξης	Παθολογική πρωτεΐνη	Αναφορές
ΕΑ-Ισλανδική	20	Cyst C	A→T κωδικόνιο 68, Glu→Leu στην 11Cys	E68Q, ACys-Q68	ACys (20 KDa)	(124, 125)
Οικογενής Βρετανική άνοια	13	BRI	TGA→AGA κωδικόνιο 267, κωδικόνιο τερματισμού→Arg	Stop267R	ABri (4 KDa)	(126, 127)
Ουγγρική οικ. ΑΑ	18	TTR	A→G κωδικόνιο 18, Asn→Gly	N18G, ATTR-G18	ATTR (10 KDa)	(128)
Αμερικανική οικ. ΑΑ	18	TTR	T→G κωδικόνιο 30, Val→Gly	V30G, ATTR-G30	ATTR (10 KDa)	(130)
Volga German οικ. ΑΑ	1	presenilin-2	A→T κωδικόνιο 141, Asn→Ile	N141I	Aβ (4 KDa)	(133)
Flemish οικ. ΑΑ	21	AβPP	C→G κωδικόνιο 692, Ala→Gly (Αβ 21)	A692G, Αβ-G21	Aβ (4 KDa)	(137)
Dutch οικ. ΑΑ	21	ΑβPP	G→C κωδικόνιο 693, Glu→Gln (Αβ 22)	E693Q, Αβ-Q22	Αβ (4 KDa)	(139)
Arctic οικ. ΑΑ			A→C κωδικόνιο 693, Glu→Gly (Αβ 22)	E693G, Αβ-G22		(140)
Italian οικ. ΑΑ			G→A κωδικόνιο 693, Lys→Glu (Αβ 22)	K693E, Αβ-E22		(141)
Iowa οικ. ΑΑ	21	ΑβPP	G→A κωδικόνιο 694, Asp→Asn (Αβ 23)	D694N, Αβ-N23	Αβ (4 KDa)	(138)

Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία σε οικογένειες με αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια εγκεφάλου

Κολλαγόνο τύπου IVα1 (COL4A1)

Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις στο COL4A1 γονίδιο (Collagen type IVα1) επάγουν την εκδήλωση περιγεννητικής εγκεφαλικής αιμορραγίας και πορεγκεφαλίας. Τα ετερόζυγα ποντίκια (Col4a1^{+/-Δ40}) (εντός του πλαισίου έλλειψη του 40^{ου} εξονίου) αναπτύσσουν υποτροπιάζουσες αιμορραγίες στα βασικά γάγγλια, που αποτελούν το κύριο σημείο εμφάνισης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας σε υπερτασικούς ασθενείς (142). Η ανάλυση οικογενειών που πάσχουν από πορεγκεφαλία και νόσο των μικρών αγγείων του εγκεφάλου απεκάλυψε την ύπαρξη πολλών μεταλλάξεων στο ανθρώπινο COL4A1 γονίδιο (142-144). Συγκεκριμένα, σε μια οικογένεια Ολλανδών με πορεγκεφαλία και υποτροπιάζουσες ΕΑ βρέθηκε μετάλλαξη στη θέση G3706A (Gly1236Arg) του COL4A1 γονιδίου (142). Επίσης, σε μια οικογένεια από την Γαλλία με νόσο των μικρών αγγείων του εγκεφάλου και ΕΑ κατά τη γέννηση ή αργότερα κατά την ενήλικη ζωή βρέθηκε μια G1769A μετάβαση στο εξόνιο 25, που οδηγεί σε αντικατάσταση της γλυκίνης από γλουταμινικό οξύ στη θέση 562 της αλληλουχίας του COL4A1 γονιδίου (145).

Τα κολλαγόνα τύπου IV αποτελούν τα κύρια συστατικά της βασικής μεμβράνης των αγγείων. Τα COL4A1 και COL4A2 είναι οι πιο άφθονες μορφές των κολλαγόνων τύπου IV και σχηματίζουν ετεροτριμερή. Η τριπλή έλικα περιέχει επαναλαμβανόμενα μοτίβα γλυκίνης-προλίνης-Χ, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της έλικας κατά τη δημιουργία του κολλαγόνου. Οι περισσότερες μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί αφορούν τα κατάλοιπα γλυκίνης στο εσωτερικό των μοτίβων. Έτσι, υποστηρίζεται ότι οι μεταλλάξεις στο COL4A1 γονίδιο παρεμβαίνουν στο σχηματισμό της τριπλής έλικας ή στην έκκριση των ετεροτριμερών. Επίσης, μελέτες σε Col4a1^{+/-Δ40} εμβρυϊκό ιστό φανερώνουν ότι οι μεταλλάξεις αναστέλλουν την έκκριση του κολλαγόνου στη βασική μεμβράνη. Οι φορείς μεταλλάξεων στο COL4A1 γονίδιο εμφανίζουν δομικές ανωμαλίες στα τριχοειδή, λόγω ανώμαλης σύστασης της βασικής μεμβράνης. Το φαινοτυπικό φάσμα των μεταλλάξεων στο COL4A1 γονίδιο είναι ευρύ και σχετίζεται κυρίως με τη νόσο των μικρών αγγείων του εγκεφάλου, ενώ τα κλινικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν λευκοεγκεφαλοπάθεια, μικροαιμορραγίες και ασυμπτωματική αιμορραγία. Η παθολογία των μικρών αγγείων στους φορείς μεταλλάξεων στο COL4A1 γονίδιο φαίνεται επίσης από το γεγονός ότι το τραύμα κατά τη γέννηση, το εγκεφαλικό τραύμα και η αντιπηκτική αγωγή μπορεί να προκαλέσει ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.

CADASIL

Η νόσος CADASIL (cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and arteriopathy: αυτοσωμική-επικρατής εγκεφαλική αρτηριοπάθεια με υποφλοιώδη έμφρακτα και αρτηριοπάθεια) είναι μια μη-αμυλοειδική, μη-αθηροσκληρωτική αρτηριοπάθεια που προκαλεί προοδευτικό εκφυλισμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Επιδρά κυρίως στα μικρά αγγεία του εγκεφάλου και επάγεται από μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο Notch 3 γονίδιο, το οποίο έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19 στη θέση 19q13 (146). Η κληρονόμηση είναι αυτοσωμική-επικρατής, αν και έχουν αναφερθεί νέες (de novo) μεταλλάξεις. Το Notch 3 γονίδιο περιέχει 33 εξόνια, ενώ έχουν βρεθεί πάνω από 60 μεταλλάξεις, που είναι υπεύθυνες για το σύνδρομο αυτό. Οι περισσότερες από αυτές εντοπίζονται στο εξόνιο 4. Η συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου αυτού παραμένει άγνωστη. Παρόλα αυτά, έχουν δημοσιευθεί παγκοσμίως περίπου 500 οικογένειες με CADASIL και θεωρείται η πιο συχνή αιτία ανάπτυξης οικογενούς άνοιας. Η κλινική εικόνα ποικίλει και περιλαμβάνει ισχαιμικά ΑΕΕ ή παροδικά ΑΕΕ, επεισόδια ημικρανίας συνήθως με αύρα, νοητική έκπτωση, υποφλοιώδη άνοια, συναισθηματικές διαταραχές και επιληπτικές κρίσεις. Η μαγνητική τομογραφία αποκαλύπτει έντονη περικολιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια, ενώ με τη χρήση ειδικών ακολουθιών ανευρίσκονται μικροαιμορραγίες σε ποσοστό έως και 69% των ασθενών, ιδίως στις υποφλοιώδεις περιοχές και στο θάλαμο (147). Ασθενείς με CADASIL μπορούν να παρουσιάσουν στη διάρκεια της ζωής τους ΕΑ σε ποσοστό έως 25% (148).

Σποραδικές μορφές-Μελέτες συσχέτισης

ΑpoE

Η απολιποπρωτεΐνη Ε (ΑpoE) αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ΠΕΑ που οφείλεται σε ΑΑ. Μελέτες φανερώνουν ότι τα ε2 και ε4 αλληλόμορφα της ΑΡΟΕ επηρεάζουν θετικά την ανάπτυξη της νόσου με διαφορετικούς μηχανισμούς (108, 109) που έχουν σχέση κυρίως με την εναπόθεση Αβ αμυλοειδούς και τη διάσπαση του τοιχώματος των αγγείων, προκαλώντας έτσι αιμορραγία. Πιο ειδικά, η ε4 ισομορφή σχετίζεται θετικά με μια δόσοεξαρτώμενη αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδούς στα αγγεία και στις γεροντικές πλάκες (108) και έχει βρεθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΠΕΑ(108, 149). Απ' την άλλη πλευρά, η ε2 ισομορφή είναι υπεύθυνη για τις βλάβες των αγγείων στην ΑΑ, όπως τον ομόκεντρο διαχωρισμό του τοιχώματος των αγγείων και την ινδοειδή νέκρωση (109). Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης της ε2 ισομορφής στη

διάσπαση του αγγειακού τοιχώματος δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Να σημειωθεί όμως ότι τα αποτελέσματα της συσχέτισης της AροE με την ΠΕΑ σε διάφορους πληθυσμούς είναι αντικρουόμενα(109, 150-154).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα αλληλόμορφα ε2 και ε4 του γονιδίου της AροE σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοβώδους EA(155). Πιθανώς η συσχέτιση αυτή είναι αποτέλεσμα παρουσίας AA του εγκεφάλου των ασθενών με ΠΕΑ. Σε μια μελέτη επιπλέον φάνηκε ότι το αλληλόμορφο ε4 σχετίζεται με πρωιμότερη ηλικία εμφάνισης της EA(149).

Φορείς των αλληλομόρφων ε2 και ε4 έχουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της αιμορραγίας σε σχέση με τους ασθενείς που φέρου το αλληλόμορφο ε3(31). Επιπλέον η παρουσία του ε4 αλληλομόρφου της AροE έχει συσχετισθεί κακή έκβαση των ασθενών με ΠΕΑ (156).

VKORC1

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα των γενετικών μελετών είναι η συσχέτιση ενός απλότυπου του VKORC1 γονιδίου (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1) με την εμφάνιση ΑΕΕ (ισχαιμικού και αιμορραγικού), στεφανιαίας νόσου και διαχωρισμού της αορτής (157). Υποστηρίζεται ότι ο μηχανισμός συσχέτισης πιθανό να επιδρά στην αιμόσταση, την αποτιάνωση των αγγείων και την αγγειογένεση. Επίσης, πρόσφατα έχει βρεθεί ότι ο πολυμορφισμός του VKORC1 γονιδίου σχετίζεται με διαφορετική ευαισθησία των ατόμων στη ρύθμιση της αντιπηκτικής αγωγής.

Interleukin-6 (IL-6)

Σε μια πρόσφατη μελέτη 282 ασθενών με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και 2010 ατόμων ελέγχου διερευνήθηκαν 202 πολυμορφισμοί 152 γονιδίων, τα οποία σχετίζονταν με τη βιολογία των αγγείων, τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, τη βιολογία των λευκοκυττάρων, τους μηχανισμούς πήξης και ινοδόλυσης, τη ρύθμιση της κυκλοφορίας, την αρτηριακή πίεση, τη λειτουργία των ενδοκρινών αδένων, καθώς και τον μεταβολισμό των λιπιδίων, της γλυκόζης, της ομοκυστεΐνης και άλλων μεταβολικών παραγόντων. Βρέθηκε ότι ο -572G/C πολυμορφισμός του γονιδίου της IL-6 σχετίζεται με την εκδήλωση ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας ($P<0.001$). Υποστηρίζεται ότι ο πολυμορφισμός του γονιδίου της IL-6 πιθανό να επάγει την παραγωγή των μεταλλοπρωτεασών της μεσοκυττάριας ουσίας, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον εκφυλισμό της εξωκυττάριας ουσίας και του τοιχώματος των αγγείων (158).

Παράγοντας XIII

Έχει βρεθεί μια συσχέτιση ανάμεσα σε μια σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 34 του 2^{ου} εξονίου του γονιδίου του παράγοντα XIII (Val34Leu) και την εμφάνιση EA(159). Η συσχέτιση αυτή βασίστηκε στην προστατευτική δράση της εν λόγω μετάλλαξης ενάντια στην εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου, αφού εμπλέκεται στο σχηματισμό του πλέγματος της ινικής. Με τον τρόπο αυτό, η μετάλλαξη πιθανό να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης EA, λόγω σχηματισμού ασθενών δομών ινικής. Στη μελέτη αυτή, όπου έλαβε μέρος μια μεγάλη ομάδα ασθενών που υπέστησαν ισχαιμικό ή αιμορραγικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, βρέθηκε ότι η συχνότητα της μετάλλαξης ήταν αυξημένη στους ασθενείς με EA, σε σύγκριση με τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου και εκείνους με ισχαιμικό AEE(159). Ωστόσο, σε μια παρόμοια μελέτη δεν προέκυψε συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό του παράγοντα XIII και την εκδήλωση EA (160). Τα αντιφατικά αυτά αποτελέσματα πιθανό να οφείλονται σε διαφορές στις ομάδες των ασθενών που έλαβαν μέρος στις δύο παραπάνω μελέτες. Ο πολυμορφισμός μελετήθηκε ακολούθως εκτεταμένα σε διάφορους πληθυσμούς με αντιφατικά αποτελέσματα(161-164).

Το γονίδιο της endoglin

Έχει ταυτοποιηθεί μια ένθεση 6 βάσεων στο γονίδιο της endoglin, η οποία εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με σποραδική EA. Η ένθεση αυτή βρέθηκε σε ποσοστό 8% σε ασθενείς με EA και σε ποσοστό 2% στη φυσιολογική ομάδα ελέγχου(165). Η endoglin αλληλεπιδρά με τον TGF-β παράγοντα (transforming growth factor-β) και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και αναδόμηση των αγγείων. Η εξασθένηση της λειτουργίας της endoglin μειώνει την απόκριση του ενδοθηλίου στον TGF-β παράγοντα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αγγειακής νόσου. Το γονίδιο της endoglin έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 9 και εμπλέκεται επίσης στην εμφάνιση κληρονομικής αιμορραγικής τηλαγγειεκτασίας, τον ανώμαλο σχηματισμό αρτηριών και φλεβών και την ανάπτυξη ενδοκράνιων ανευρυσμάτων.

Το γονίδιο του PAF-H

Το PAF-H ένζυμο (platelet activating factor acetylhydrolase) αναστέλλει τη δράση του PAF παράγοντα, που παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της θρόμβωσης. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη δραστηριότητα του PAF-H ενζύμου στο πλάσμα ασθενών με ισχαιμικό AEE γεγονός που αποδόθηκε στη σύνδεσή του με την LDL λιποπρωτεΐνη

(low-density lipoprotein). Μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη (Val2793Phe) στο γονίδιο του PAF-H ενζύμου φαίνεται ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης. Η μετάλλαξη στο PAF-H γονίδιο έχει συσχετιστεί επίσης με ισχαιμικό ΑΕΕ καθώς και ΕΑ (166).

ACE γονίδιο (μετατρεπτικό ένζυμο)

Το μετατρεπτικό ένζυμο εμπλέκεται στην παθολογία του αρτηριακού τοιχώματος και τον πηκτικό μηχανισμό. Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Μέχρι στιγμής έχουν δημοσιευτεί δύο μελέτες συσχέτισης του πολυμορφισμού I/D στο ιντρόνιο 16 του γονιδίου του ACE. Πρώτη μελέτη ήταν αρνητική(167), ενώ η δεύτερη μελέτη έδειξε ότι ο πολυμορφισμός σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης ΠΕΑ στα βασικά γάγγλια(168). Ωστόσο, μετά τη σταθεροποίηση για άλλους παράγοντες κινδύνου στο μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης η συσχέτιση δεν ήταν πλέον στατιστικά σημαντική.

Lipoprotein a [Lp(a)]

Τα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης a έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων συμπεριλαμβανομένων των ισχαιμικών ΑΕΕ. Σε μια εκτεταμένη πολυκεντρική μελέτη σε Κινεζικό πληθυσμό βρέθηκε αυξημένη συχνότητα του PNTR (TTTТА επαναλήψεις) πολυμορφισμού της Lp(a) σε ασθενείς με αιμορραγικό ΑΕΕ(169).

Apolipoprotein H (ApoH)

Η απολιποπρωτεΐνη H εμπλέκεται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στο μηχανισμό πήξης. Επίσης, έχει βρεθεί ότι αυξάνει την αρτηριακή πίεση. Για το λόγο αυτό διάφοροι πολυμορφισμοί της έχουν μελετηθεί σε ασθενείς με ΠΕΑ. Διαπιστώθηκε ότι ο Ser88Asn πολυμορφισμός σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ΠΕΑ(170).

Platelet glycoproteins

Οι γλυκοπρωτεΐνες GP Ia, GP IbA και GP IIIa είναι υποδοχείς της επιφάνειας των αιμοπεταλίων και σχετίζονται με τις διαδικασίες συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και πήξης. Πολυμορφισμοί των παραπάνω υποδοχέων δε φαίνεται ότι αυξάνουν τον κίνδυνο πρόκλησης ΠΕΑ(171).

Αναφορά	Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Μεθοδολογία	Φαινότυπος	Αποτελέσματα	Σχόλια
Μενδελιανή κληρονομικότητα						
Gould et al. (2006)	COL4A1	G1769A	1 οικογένεια (5 προσβεβλημένα μέλη)	ΕΑ, λευκοεγκεφαλοπάθεια,	θετικό	
Could et al (2005)	COL4A1	G3706A	1 οικογένεια (3 προσβεβλημένα μέλη)	Πορεγκεφαλία, λευκοεγκεφαλοπάθεια, ΕΑ	θετικό	
Joutel et al. (1996)	Notch 3	>60 μεταλλάξεις	>500 οικογένειες	CADASIL με μικροαιμορραγίες και ΕΑ	θετικό	Στο CADASIL 69% εμφανίζουν μικροαιμορραγίες και 25% ΕΑ
Σποραδική ΠΕΑ						
Yamada et al. (2006)	152 υποψήφια γονίδια	202 πολυμορφισμοί	282 ασθενείς και 2010 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό	Το C αλληλόμορφο του -572G/C πολυμορφισμού της IL-6 ήταν παράγοντας κινδύνου για ΠΕΑ. OR (95%CI)=1,57 (1,21-2,07), p<0.001
Wang et al. (2006)	VKORC1	5 SNPs	499 ασθενείς 1811 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό	Το C αλληλόμορφο του +2255C/T πολυμορφισμού OR (95%CI)=1,53 (1,09-2,16), p<0,05
Yoshida et al. (1998)	PAF-H	Val279Phe	99 ασθενείς 270 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό	p <0.05
Nicoll et al. (1997)	ApoE	Apoε2/ε3/ε4	36 ασθενείς με ΑΑ	ΠΕΑ σχετιζόμενη με ΑΑ	θετικό	ε2 αλληλόμορφο
Greenberg et al (1998)	ApoE	Apoε2/ε3/ε4	48 ασθενείς με ΑΑ 49 υπερτασική ΕΑ 87 μάρτυρες	ΠΕΑ σχετιζόμενη με ΑΑ	θετικό αρνητικό	ε2, ε4 αλληλόμορφα
McCarron et al (1999)	ApoE	Apoε2/ε3/ε4	40 ασθενείς με ΑΑ 71 υπερτασική ΕΑ 406 μάρτυρες	ΠΕΑ σχετιζόμενη με ΑΑ	θετικό αρνητικό	ε2 αλληλόμορφο (p<0.01)
McCarron et al (1999) (172)	ApoE	Apoε2/ε3/ε4	74 ασθενείς με ΠΕΑ 640 ασθενείς με ΑΕΕ	Έκβαση ΠΕΑ	αρνητικό	
Carcia et al (1999)	ApoE	Apoε2/ε3/ε4	48 ασθενείς 24 μάρτυρες 173 άτομα από το γενικό πληθυσμό	24 ασθενείς με λοβώδη και 24 με υπερτασική ΠΕΑ	αρνητικό	

Αναφορά	Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Μεθοδολογία	Φαινότυπος	Αποτελέσματα	Σχόλια
Chowdhury et al (2001)	ApoE	Apoε2/ε3/ε4	80 ασθενείς 190 μάρτυρες	ΠΕΑ σε άτομα ηλικίας >60 ετών	θετικό	Αλληλόμορφο ε2 OR (95%CI) 19,2 (1,3-295,2), p<0,05
Xia et al (2004)	ApoH	G341A G817T G1025C C1080T	140 ασθενείς 100 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό	Μόνο για τον G341A πολυμορφισμό
Sun et al (2003)	Lp(a)	TNTR πολυμορφισμός	499 ασθενείς 1817 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό	OR (95%CI)=1,62 (1,09-2,37), p<0,001
Alberts et al. (1997)	Endoglin	6 base insertion in intron 6	103 ασθενείς 202 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό	OR (95%CI)=4,8 (1,28-21,6), p<0,012
Catto et al (1996)	ACE	I/D πολυμορφισμός	49 ασθενείς 231 μάρτυρες	ΠΕΑ	αρνητικό	
Slowik et al (2004)	ACE	I/D πολυμορφισμός	58 ασθενείς 116 μάρτυρες	ΠΕΑ στα βασικά γάγγλια	θετικό	DD γονότυπος p=0.02
Vila et al (1999)	ACT	-15A/T	38 ασθενείς 70 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό	ΤΤ γονότυπος OR (95%CI)= 2.3 (1.0 to 5. 2)
Obach et al(2000)	ACT	-15A/T	99 ασθενείς 80 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό	ΤΤ γονότυπος, πιο εμφανή τα αποτελέσματα στους μη υπέρτασικούς
Pera et al (2006)(173)	ACT	-15A/T	95 ασθενείς 190 μάρτυρες	ΠΕΑ	αρνητικό	
Iniesta et al (2003)	GP Ia GP IbA GP IIIa	807 C/T, HPA-5 VNTR HPA-1	141 ασθενείς 141 μάρτυρες 446 άτομα από το γενικό πληθυσμό	ΠΕΑ	αρνητικό	
Catto et al (1998)	XIII	Val34Leu	62 ασθενείς 436 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό	p=0.05
Corral et al (2000)	XIII	Val34Leu	116 ασθενείς 465 μάρτυρες	ΠΕΑ	αρνητικό	
Reiner et al (2001)	XIII XIII XIII PAI	Val34Leu Tyr204Phe Pro564Leu -675 4G/5G	42 ασθενείς 345 μάρτυρες	ΠΕΑ σε γυναίκες ηλικίας <45 ετών	αρνητικό θετικό θετικό αρνητικό	Ετερόζυγοι: 2,09 (1,1-7,5) Ομόζυγοι: 4,3 (1,4-1,7)
Cho et al (2002)	XIII	Val34Leu	58 ασθενείς 48 μάρτυρες	ΠΕΑ	αρνητικό	

Αναφορά	Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Μεθοδολογία	Φαινότυπος	Αποτελέσματα	Σχόλια
Endler et al (2003)	XIII	Val34Leu	94 ασθενείς 369 μάρτυρες	ΠΕΑ	αρνητικό	
Corral et al (2001)(161)	F-V leiden F-II F-VII XIII	Leiden 20210A 323 D/I Val34Leu	201 ασθενείς 201 μάρτυρες	ΠΕΑ	θετικό αρνητικό θετικό αρνητικό	0,19 (0,03-0,95) 1,54 (1,03-2,72)
Li et al (2003)	MTHFR	C677T	503 ασθενείς 1832 μάρτυρες	ΠΕΑ	αρνητικό	
McCarron et al (2003)(174)	IL-1a	(-899)	42 ασθενείς 232 AD ασθενείς 167 μάρτυρες	Αιμορραγία από αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια	αρνητικό	

A1-αντιχυμοθρυψίνη (ACT)

Η α₁-αντιχυμοθρυψίνη είναι ένα μέλος της οικογένειας των γονιδίων που κωδικοποιούν τους αναστολείς των πρωτεασών σερίνης (σερπίνες-serpins)(175). Οι σερπίνες είναι μια υπεροικογένεια πρωτεϊνών που ρυθμίζουν ποικίλες λειτουργίες, όπως ο έλεγχος της πήξης του αίματος, η ινωδόλυση, η φλεγμονώδης αντίδραση, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η αγγειογένεση και η ανάπτυξη .

SERPINS			
Gene	Serpin+	Function /target	location
Inhibitors			
α1-antitrypsin	A1	Elastase	14q
α1-antichymotrypsin	A3	Chymotrypsin, Cathepsin G	14q
Kallistatin	A4	Tissue kallikrein	14q
Protein C inhibitor	A5	protein C	14q
Centerin	A9	Maturation of naive B-cells	14q
Protein Z-dependent protease inhibitor	A10	Factor Xa	14q
Antithrombin III	C1	Thrombin, factor Xa , also anti-angiogenesis	6p
Heparin cofactor II	D1	Thrombin, chymotrypsin	22q
Plasminogen activator inhibitor-1	E1	Tissue-type plasminogen activator	7q
α2-antiplasmin	F2	Plasmin	17q
C1 inhibitor	G1	4 Complement C1 esterase	11q
Neuroserpin	I1	Plasminogen activator, urokinase, plasmin	3q
Pancpin	I2	Pancreatic tumor repressor	3q
Non-inhibitory			
Thyroxine-binding globulin	A6	Hormone carrier T3, T4	X
Corticosteroid binding globulin	A7	Hormone carrier	14q
Angiotensinogen	A8	Hormone precursor, blood pressure regulation	1q
Pigment epithelium-derived factor	F1	4 Neurotrophic factor	17q
Collagen binding protein 1	H1	6 Molecular chaperone for collagens	11q
Collagen binding protein 2	H2	6 Collagen, HSP function	11q
Glia-derived nexin	E2	Neurite outgrowth, also thrombin	X
Intracellular			
Monocyte/neutrophil elastase inhibitor	B1	Protease 3, cathepsin G	6p
Plasminogen activator inhibitor-2	B2	Tissue-type plasminogen activator, intracellular signalling	18q
Squamous cell carcinoma antigen-1	B3	Papain-like cysteine proteases	18q
Squamous cell carcinoma antigen-2	B4	Papain-like cysteine proteases	18q
Maspin	B5	Tissue-type plasminogen activator, prevents metastasis	18q
Cytoplasmic antiprotease	B6	Cathepsin G	18q
Megsin	B7	Unkown	18q
Cytoplasmic antiprotease 2	B8	Furin	18p
Cytoplasmic antiprotease 3	B9	Granzyme B, subtilisin A	6p
Bomapin	B10	Serine proteases	18q
Epipin	B11	Unkown	18q
Yukopin	B12	Trypsin	18q
Headpin	B13	Unkown	18q

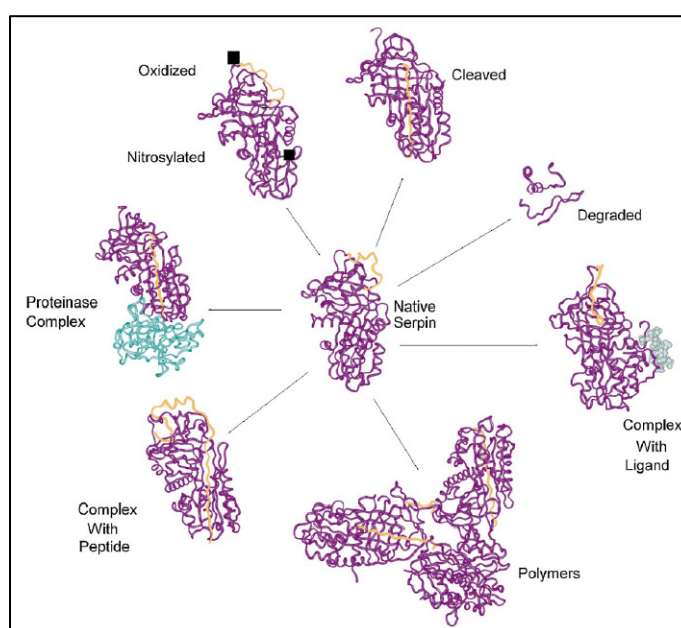
Η ομάδα των σερπινών με τις κυριότερες δράσεις τους

Η ACT είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 55-66kDa. Έχει βρεθεί ότι το 25% της μοριακής μάζας της ACT αποτελείται από υδατάνθρακες. Η βιολογικά ενεργή πρωτεΐνη αποτελείται από 394 αμινοξέα και λειτουργεί ως αναστολέας πρωτεασών σερίνης με δράση χυμοθρυψίνης. Η δομή της ACT παρουσιάζει 45% ομοιότητα με αυτή της α1-αντιθρυψίνης(175).

Η ACT είναι μια πρωτεΐνη οξειάς φάσης. Για το λόγο αυτό, η συγκέντρωσή της στο πλάσμα αυξάνεται σημαντικά (5-10 φορές) ως αποτέλεσμα της οξειάς ή χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης(176). Η ACT συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και είναι μια από τις κυριότερες σερπίνες που συναντώνται στο ανθρώπινο πλάσμα(175). Πολλές μελέτες σε άλλους ιστούς φανερώνουν ότι η ACT συντίθεται από ποικίλους κυτταρικούς τύπους, όπως τα μονοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη, του μαστού(177), των πνευμονικών κυψελίδων και του ανθρώπινου εντέρου. Το mRNA της ACT έχει ανιχνευτεί στην καρδιά, τον πνεύμονα και το νεφρό(178). Στον εγκεφαλικό ιστό η ACT παράγεται από τα νευρικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα(179) αλλά και από τα κύτταρα της γλοίας(180) και εμπλέκεται σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του εγκεφάλου(181).

Η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης συνδυάζει μεγάλες β-πτυχωτές επιφάνειες με 8 έλικες, όπου συμμετέχει το 80% των αμινοξέων της ACT. Οι βιολογικά ενεργές σερπίνες έχουν κινητά ενεργά κέντρα με μορφή βρόχων, τα οποία είναι επιρρεπή στην πρωτεόλυση που προκαλείται από μια ποικιλία πρωτεϊνών(182, 183). Επίσης, έχουν περιγραφεί ποικίλες μη-ενεργές διαμορφώσεις σερπινών, όπως το σύμπλοκο σερπίνης/πρωτεΐνωσης-στόχου, η πολυμερισμένη ή οξειδωμένη σερπίνη και η σερπίνη που στερεείται βρόχου(184).

Οι ποικίλες διαμορφώσεις των σερπινών. Το μοβ χρώμα αντιπροσωπεύει τη σερπίνη και το κίτρινο χρώμα απεικονίζει το ενεργό κέντρο.



Έχει βρεθεί ότι το σύμπλοκο ACT/πρωτεΐνωσης-στόχου αναγνωρίζεται από υποδοχείς της κυτταρικής επιφανείας και απομακρύνεται ταχύτατα από την κυκλοφορία του αίματος(185). Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι στα ποντίκια το 50% του συμπλόκου απομακρύνεται από την κυκλοφορία σε 15min. Αντίθετα, η ACT που στερείται βρόχου απομακρύνεται με πολύ αργό ρυθμό. Αυτό συμβαίνει επειδή η μορφή αυτή δεν αναγνωρίζεται από υποδοχείς της κυτταρικής επιφανείας. Επιπλέον, η μορφή αυτή αποτελεί έναν ισχυρό χυμοτακτικό παράγοντα για τα ουδετερόφιλα, γεγονός που δεν ισχύει για το βιολογικά ενεργό μόριο της ACT. Η χυμοτακτική αυτή δραστηριότητα εξαρτάται από την αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου που λαμβάνει χώρα μετά τη διάσπαση του βρόχου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι δύο αυτές μη-ενεργές μορφές της ACT μπορούν να επάγουν τη σύνθεση της IL-6 που συμμετέχει στην οξεία φάση της φλεγμονώδους αντίδρασης(186).

Βιολογικές λειτουργίες της ACT

Αναστολή πρωτεασών-αντιφλεγμονώδης δράση

Πολλές βιολογικές λειτουργίες έχουν αποδοθεί στην ACT, η πιο σημαντική των οποίων είναι η αναστολή των πρωτεϊνών-στόχων. Διάφορες παθολογικές καταστάσεις μεταξύ των οποίων και η ΠΕΑ έχουν σαν αποτέλεσμα την επαγωγή δευτεροπαθών αλλοιώσεων στο σημείο της βλάβης, όπως η δημιουργία οιδήματος, η διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων, η έκκριση κυτοκινών(121) και η απελευθέρωση πρωτεασών(187). Η ACT είναι πρωτεΐνη οξείας φάσης και εκκρίνεται από το ήπαρ με σκοπό την αναστολή των πρωτεασών και τον περιορισμό της πρωτεολυτικής τους δράσης(175). Πέρα όμως από το ήπαρ και τη συστηματική της δράση, η ACT εκκρίνεται τοπικά στους διάφορους ιστούς με σκοπό την αναστολή της φλεγμονής(175). Έχει βρεθεί ότι στον εγκεφαλικό ιστό μετά από ΑΕΕ ή μηχανική κάκωση υπάρχει αυξημένη έκφραση της ACT στα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα με σκοπό την αναστολή των τοπικά παραγόμενων πρωτεασών σερίνης(188).

Πιο συγκεκριμένα, η ACT αναστέλλει τη χυμάση των μαστικών κυττάρων(189), η οποία εμπλέκεται σε πολλές φλεγμονώδεις και αλλεργικές διεργασίες, προκαλεί το διαχωρισμό της επιδερμίδας από τη δερμίδα, τη μετατροπή της Ang I σε Ang II και τη μείωση της ανάπτυξης των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών. Επίσης, η ACT αναστέλλει μια σειρά πρωτεασών των φλεγμονωδών κυττάρων με δράση παρόμοια με αυτής της χυμοθρυψίνης (Chymotrypsin-like enzymes)(175).

Η κύρια όμως πρωτεάση-στόχος της ACT είναι η καθεψίνη G (Cat G) των ουδετερόφιλων. Η Cat G έχει αντιμικροβιακή δράση και συμβάλλει στην άμυνα έναντι

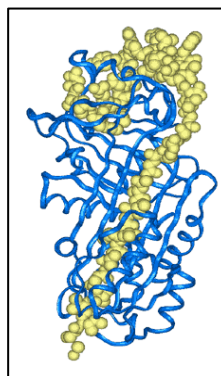
των μικροοργανισμών. Η Cat G εμπλέκεται στη διάσπαση μιας σειράς ουσιών της θεμέλιας ουσίας και των πρωτεϊνών του πλάσματος(178, 190, 191), όπως κολλαγόνο τύπου II, ελαστίνη, πρωτεογλυκάνες, φμπρονεκτίνη, λαμινίνη, ανοσοσφαιρίνες G και M, συστατικά του συμπληρώματος και παράγοντες πήξης. Επίσης, η Cat G καταλύει τη δημιουργία Ang II από τη διάσπαση της Ang I ή απευθείας από το αγγιοτενσινογόνο εντός του τοιχώματος του αγγείου και για το λόγο αυτό έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη αθηρωματικών βλαβών στα αγγεία(178, 192). Η Cat G τέλος εμπλέκεται στον πηκτικό μηχανισμό μέσω της διάσπασης των παραγόντων VIII και XII και της συμμετοχής της στη ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων(178, 193). Επομένως η ACT μέσω της αναστολής της Cat G, έχει αντιθρομβωτικές ιδιότητες και ασκεί αντιφλεγμονώδεις και προστατευτικές δράσεις στο εγκεφαλικό παρέγχυμα και στα αγγεία(188, 194, 195).

Σχηματισμός αμυλοειδικών ινιδίων και συμβολή στη νόσο Alzheimer

Μελέτες φανερώνουν ότι η ACT επιταχύνει το ρυθμό σχηματισμού αμυλοειδικών ινιδίων in vitro, οπότε παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer (AD). Είναι γνωστό ότι το κύριο συστατικό των πλάκων στον εγκέφαλο ασθενών που πάσχουν από AD είναι η πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς (Αβ). Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα πεπτίδιο με μοριακό βάρος 4KDa και προέρχεται από την πρωτεολυτική διάσπαση του προδρόμου μορίου του β-αμυλοειδούς (βAPP).

Σε ασθενείς που πάσχουν από AD βρέθηκε ότι τα αστροκύτταρα που βρίσκονται γύρω από τις χαρακτηριστικές πλάκες της νόσου παράγουν ACT. Επίσης, η έκφραση του mRNA της ACT αυξάνεται σημαντικά στη φαιά ουσία των ασθενών, ενώ σπάνια ανιχνεύεται στον φυσιολογικό εγκέφαλο(188). Έχει βρεθεί ότι η ACT σχηματίζει σύμπλοκο με το πεπτίδιο του β-αμυλοειδούς και προάγει τη δημιουργία Αβ ινιδίων και την εναπόθεσή τους στην AD(194, 196, 197). Μελέτες σε διαγονιδιακά πειραματόζωα επιβεβαίωσαν ότι η ACT προάγει την εναπόθεση αμυλοειδούς στον εγκέφαλο(198, 199). Επιπλέον, η σύνδεση της ACT με το Αβ1-42 έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ανασταλτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της και τη μετατροπή της από αναστολέα πρωτεασών σε υπόστρωμα πρωτεασών(200) και προ-φλεγμονώδη ουσία(201).

Πιθανό μοντέλο συμπλόκου ανάμεσα στην πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς και την ACT.



Περαιτέρω γενετικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η ACT σχετίζεται με την απολιποπρωτεΐνη E*4 (ApoE*4) και αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την AD(202, 203). Όπως είναι γνωστό, η ApoE*4 αποτελεί τον κύριο γενετικό παράγοντα κινδύνου για τις σποραδικές περιπτώσεις της νόσου. Επομένως, οι δύο αυτές πρωτεΐνες επιταχύνουν το ρυθμό σχηματισμού αμυλοειδικών ινιδίων, τα οποία αποτελούν ένα πρώιμο χαρακτηριστικό της νόσου του Alzheimer.

Πρόσδεση του DNA

Η ACT έχει την ιδιότητα να προσδένει DNA σε μια περιοχή του μορίου της που αποτελείται από τρία αμινοξέα λυσίνης (Lys 212-214). Έχει βρεθεί ότι η αντικατάσταση της λυσίνης με γλουταμινικό οξύ οδηγεί στην απώλεια πρόσδεσης του DNA. Ωστόσο, η σημαντικότητα της ιδιότητας αυτής δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Επίσης, μελέτες φανερώνουν ότι τα αμινοξέα λυσίνης που βρίσκονται στις 391 και 396 περιοχές του μορίου της ACT εμπλέκονται στην πρόσδεση του DNA(178).

Σύνδεση με το προστατικό αντιγόνο

Περίπου το 70-90% του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA-prostate-specific antigen) σχηματίζει σύμπλοκο με την ACT, ενώ το 10-30% του συνολικού PSA (total PSA) δεν προσδένεται σε πρωτεΐνες του πλάσματος και καλείται ελεύθερο PSA (free PSA). Βρέθηκε ότι το πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη περιέχει υψηλότερα επίπεδα PSA-ACT από το πλάσμα ασθενών με καλοήγη νόσο Έτσι, το σύμπλοκο PSA-ACT του πλάσματος είναι πιο ειδικός δείκτης για τη διάγνωση και παρακολούθηση της πορείας του καρκίνου του προστάτη(178).

Άλλες δράσεις

Η ACT έχει αντιοξειδωτική δράση μέσω της αναστολής της NADPH οξειδάσης και της δημιουργίας ελευθέρων ριζών οξυγόνου(204, 205). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η ACT έχει νευροτροφικές δράσεις, συμβάλλει στη πλαστικότητα των νευρικών κυττάρων και την ανάπτυξη των συνάψεων(181, 206, 207). Αντιθέτως, η ACT παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση, επάγοντας την παραγωγή IL-1 από τα αστροκύτταρα(208). Με άλλα λόγια, η ACT κάτω από ορισμένες συνθήκες αυξάνει την φλεγμονώδη αντίδραση. Σε μια πρόσφατη μελέτη(181) υπογραμμίζεται η διπλή δράση της ACT, επιβλαβής ή προστατευτική, όταν αυτή παράγεται από τα αστροκύτταρα ή τους νευρώνες αντίστοιχα.

Επίπεδα ACT

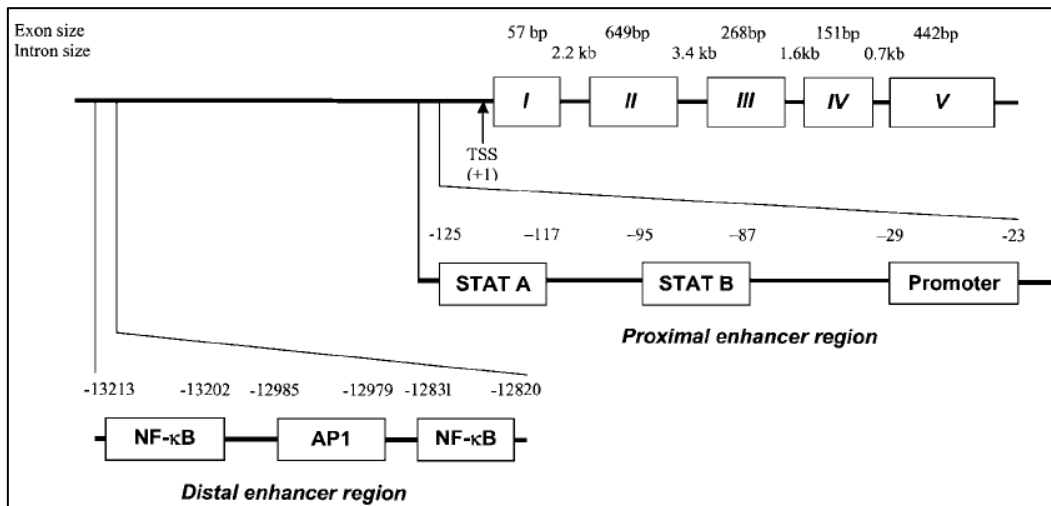
Στο πλάσμα: Σε πληθώρα μελετών βρέθηκε ότι τα επίπεδα ACT στο πλάσμα ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με νόσο Alzheimer (AD) σε σχέση με τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου(209-211) και για το λόγο αυτό η ACT θα μπορούσε να θεωρηθεί ένας βιοχημικός δείκτης για την AD. Ωστόσο, σε μερικές μελέτες δεν επιβεβαιώθηκαν τα παραπάνω αποτελέσματα(212). Τα υψηλότερα επίπεδα ACT στο πλάσμα ασθενών με AD πιθανόν να οφειλόταν σε φλεγμονώδη αντίδραση οξείας φάσης και η αύξηση της συγκέντρωσης της ACT να αποτελεί έναν δείκτη για τον πρώιμο σχηματισμό αμυλοειδικών πλακών. Είναι όμως επίσης πιθανό τα επίπεδα της ACT στο πλάσμα να βρίσκονται κάτω από το γενετικό έλεγχο πολυμορφισμών στο γονίδιο της ACT και τα υψηλότερα επίπεδα της ACT σε ασθενείς με AD να οφείλονται σε διαφορετική κατανομή των γονότυπων ανάμεσα στους ασθενείς με AD και στους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Στο ENY: Είναι γνωστό ότι μετρήσεις στο ENY αντιπροσωπεύουν πιο αξιόπιστα την κατάσταση που επικρατεί στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε σύγκριση με τις μετρήσεις στο πλάσμα. Υψηλά επίπεδα ACT έχουν ανιχνευτεί(209-211) στο ENY ασθενών με AD. Επίσης, υψηλές συγκεντρώσεις ACT βρέθηκαν στο ENY ασθενών με ατροφία πολλαπλών συστημάτων οι οποίοι είχαν ACT-AA γονότυπο σε σύγκριση με άλλους γονότυπους, καθώς και τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου(213).

Στον εγκέφαλο: Έχουν αναφερθεί υψηλά επίπεδα της ACT πρωτεΐνης στον εγκέφαλο ασθενών με AD(203).

Το γονίδιο της ACT

Το ανθρώπινο γονίδιο της ACT έχει χαρτογραφηθεί στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 14, στην περιοχή 14q32.1. Ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων που κωδικοποιούν τους αναστολείς πρωτεασών σερίνης, τα μέλη της οποίας παρουσιάζουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει και τα γονίδια που κωδικοποιούν την α1-αντιθρυψίνη, τον αναστολέα της C πρωτεΐνης και την πρωτεΐνη σύνδεσης κορτικοειδών(214). Το γονίδιο της ACT έχει μήκος περίπου 12.8 ζεύγη Kb και αποτελείται από 5 εξόνια και 4 ιντρόνια(215, 216).



Η δομή του γονιδίου της ACT. Τα κιβώτια I-V απεικονίζουν τα εξόνια του γονιδίου. Το σημείο έναρξης της μεταγραφής αριθμείται με +1 και οι ρυθμιστικές περιοχές λαμβάνουν αρνητικούς αριθμούς καθώς βρίσκονται ανοδικά από τη βάση έναρξης της μεταγραφής.

Μελέτες φανερώνουν ότι υπάρχει μια μοναδική περιοχή έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της ACT. Έχει περιγραφεί μια αλληλουχία παρόμοια με το κιβώτιο TATA (TAAATAA) που βρίσκεται μεταξύ των περιοχών -23 και -29 ανοδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Επίσης, μια αλληλουχία παρόμοια με αυτή του ρυθμιστικού στοιχείου BRE (B-recognition element) εντοπίζεται μεταξύ των περιοχών -51 και -44 ανοδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Τέλος, μια αλληλουχία παρόμοια με αυτή του στοιχείου έναρξης (INR: initiator element) (CCACTACT) βρίσκεται μεταξύ των περιοχών -2 και +6. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη η λειτουργικότητα των περιοχών αυτών.

Η IL-1, ο TNF α (tumor necrosis factor α) και η ογκοστατίνη M (OSM: μια κυτοκίνη με παρόμοια δράση με την IL-6) είναι οι κυριότεροι επαγωγείς της μεταγραφής του γονιδίου της ACT τόσο στα ηπατικά κύτταρα όσο και στα αστροκύτταρα. Αντίθετα, η IL-6 δεν μπορεί να διεγείρει τη μεταγραφή του γονιδίου της ACT στα αστροκύτταρα, λόγω της έλλειψης κατάλληλων υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια.

Μελέτες φανερώνουν ότι η δράση της OSM επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 (signal transducer and activator of transcription). Πιο συγκεκριμένα, η πρόσδεση της OSM σε ειδικό υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας προκαλεί τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης STAT3 στα κατάλοιπα τυροσίνης μέσω μιας κινάσης (Jak1-3, Tyk2). Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐ-

νη STAT3 σχηματίζει διμερές, εισέρχεται στον πυρήνα και προσδένεται σε ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου της ACT, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του. Έχουν περιγραφεί δύο περιοχές πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 που εντοπίζονται μεταξύ των θέσεων -125 και -117 (περιοχή A) και των θέσεων -95 και -87 (περιοχή B). Έχει παρατηρηθεί ότι η περιοχή A εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα STAT3.

Μελέτες σε αστροκύτταρα φανερώνουν ότι η δράση της IL-1 και του TNFα επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB (nuclear factor- kappa B) και την πρωτεΐνη AP1 (activator protein 1). Πιο συγκεκριμένα, έχει περιγραφεί μια περιοχή μεγέθους 413bp που βρίσκεται 13Kb ανοδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της ACT. Η περιοχή αυτή περιέχει τρία στοιχεία, από τα οποία τα δύο προσδένουν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB και το άλλο προσδένει την πρωτεΐνη AP1. Έχει βρεθεί ότι η περιοχή αυτή συμμετέχει στην έκφραση του γονιδίου της ACT που επάγεται από τη δράση της IL-1 και του TNFα. Οι κυτοκίνες αυτές προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφανείας και μέσω ενός ενδοκυττάρου σηματοδοτικού μονοπατιού ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB και την πρωτεΐνη AP1. Στη συνέχεια, ο NF-kB και η AP1 εισέρχονται στον πυρήνα και προσδένονται στα αντίστοιχα στοιχεία της προαναφερθείσας περιοχής επάγοντας τη μεταγραφή του γονιδίου της ACT.

Ωστόσο, μελέτες φανερώνουν ότι κυρίως η 5' περιοχή του NF-kB και η αλληλουχία της AP1 πρωτεΐνης συνεισφέρουν στην ενίσχυση της μεταγραφής του γονιδίου της ACT, ενώ η 3' περιοχή του NF-kB δε συμβάλλει στην ενεργοποίηση του γονιδίου. Έτσι, μεταλλάξεις στην αλληλουχία της AP1 πρωτεΐνης και τις λειτουργικές περιοχές του NF-kB οδηγούν στην απώλεια της δράσης των κυτοκινών στην ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της ACT.

Πολυμορφισμός του γονιδίου της ACT

Έχουν περιγραφεί πολλές μεταλλάξεις στο γονίδιο της ACT. Ανάμεσα σ' αυτές η πιο σημαντική συναντάται στο κωδικόνιο -15 του πεπτιδίου σήματος (signal peptide) και προκαλεί την αντικατάσταση ενός αμινοξέος, έτσι ώστε η ACT πρωτεΐνη να περιέχει αλανίνη (Ala)-(ACT-A) ή θρεονίνη (Thr)-(ACT-T) στην αλληλουχία των αμινοξέων της(217). Είναι γνωστό ότι το πεπτίδιο σήματος παίζει σημαντικό ρόλο στην εξαγωγή της πρωτεΐνης από το κύτταρο(218). Μια μελέτη(219) έδειξε ότι τα πεπτίδια σήματος της ACT που περιέχουν Ala, εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στα κανάλια του ενδοπλασματικού δικτύου ή τις μεμβράνες του συστήματος Golgi, επάγοντας την παραγωγή πιο γλυκοσυλιωμένης-ώριμης ACT.

Έτσι, η παρουσία της υδρόφοβης Ala, αντί για την υδρόφιλη Thr, στο πεπτιδίο οδηγού (leader peptide) πιθανόν να μεταβάλλει την μετά-μεταφραστική επεξεργασία της πρωτεΐνης, ενισχύοντας το ρυθμό έκκρισης της ACT και διευκολύνοντας το σχηματισμό αμυλοειδούς.

Επιδράσεις του πολυμορφισμού της ACT στα επίπεδα της πρωτεΐνης στο πλάσμα

Ο πολυμορφισμός αυτός επιλέχθηκε, καθώς επιδρά στην έκκριση της ACT(219) και στα επίπεδά της στο πλάσμα. Ωστόσο, μελέτες σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά στην επίδραση του πολυμορφισμού στα επίπεδα της ACT στο πλάσμα.

Σε μια μελέτη ασθενών με AD βρέθηκε ότι τα άτομα με ACT TT γονότυπο είχαν τα υψηλότερα επίπεδα σερπίνης (TT προς A,A γονότυπο: $p=0.05$)(220). Επιπλέον, σ' έναν SNAP (G/T) πολυμορφισμό στη θέση -55 του υποκινητή(179) βρέθηκε ότι το T αλληλόμορφο του υποκινητή ήταν σχεδόν σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης με το T αλληλόμορφο του πεπτιδίου σήματος. Στη μελέτη αυτή, το T αλληλόμορφο συσχετίστηκε με μια αύξηση, σε ποσοστό 22%, στα επίπεδα της ACT στο πλάσμα. Επίσης, παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση (βασική ή επαγόμενη από την ογκοστατίνη M) στην ανθρώπινη ηπατική κυτταρική σειρά Hep G2 σε ποσοστό 32% και στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά γλοίας T98G σε ποσοστό 30%.

Ωστόσο, σε μια πρόσφατη μελέτη(221) σε σειρές αστροκυττάρων COS-7 και C6 βρέθηκε ότι το αλληλόμορφο A σχετίζεται με μια αύξηση στην αναλογία της γλυκοσυλιωμένης προς τη μη-γλυκοσυλιωμένη ACT πρωτεΐνη σε σύγκριση με το T αλληλόμορφο. Τα in vitro αυτά αποτελέσματα φανερώνουν ότι τα πεπτιδία σήματος που περιέχουν Ala (ACT-15*A) διαπερνούν πιο αποτελεσματικά τους πόρους του ενδοπλασματικού δικτύου, με αποτέλεσμα τη ραγδαία έκκριση της ACT πρωτεΐνης. Επίσης, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με ατροφία πολλαπλών συστημάτων βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της ACT στο ENY ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με ACT-AA γονότυπο σε σύγκριση με τους άλλους γονότυπους καθώς και με τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου(213).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν επίσης μελέτες στις οποίες δε βρέθηκε καμιά συσχέτιση ανάμεσα στους γονότυπους του ACT πολυμορφισμού και τα επίπεδα ACT στο πλάσμα σε ασθενείς με AD και στις φυσιολογικές ομάδες ελέγχου(222, 223).

Τα αντιφατικά αυτά ευρήματα πιθανόν να οφείλονται σε άλλους παράγοντες, όπως για παράδειγμα σε περιφερική φλεγμονώδη αντίδραση ή σε επιπρόσθετους γενετικούς παράγοντες(224), που επηρεάζουν τα επίπεδα της ACT και επικαλύπτουν

τις επιδράσεις του πολυμορφισμού της ACT. Πιο συγκεκριμένα, σε μια εργασία βρέθηκε ότι τα επίπεδα της ACT στο πλάσμα ασθενών με AD σχετίζονται με το γονότυπο της απολιποπρωτεΐνης E (APOE). Έτσι, τα υψηλότερα επίπεδα ACT ανιχνεύτηκαν στον E3/E3 γονότυπο, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα στον γονότυπο E4/E3. Επίσης, η απουσία του APOE*4 αλληλομόρφου σχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα ACT στο πλάσμα σε σύγκριση με τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου. Γίνεται λοιπόν φανερό ότι διαφορετικοί γονιδιακοί τόποι μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα της ACT.

Συσχετίσεις του ACT πολυμορφισμού

AD: Έχει βρεθεί ότι ο ACT πολυμορφισμός στο πεπτιδίο σήματος αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της AD(219). Επίσης, ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται να τροποποιεί την ήδη επιβεβαιωμένη συσχέτιση μεταξύ του E4 αλληλομόρφου της APOE (APOE*4) και της AD(219). Μερικές μελέτες επιβεβαιώνουν το εύρημα αυτό(225, 226), ενώ σε άλλες προκύπτουν αντιφατικά αποτελέσματα(227, 228). Επίσης, μια σειρά μελετών διερευνά τον πιθανό μηχανισμό συσχέτισης της ACT πρωτεΐνης με την εκδήλωση της AD, παρουσία του ε4 αλληλομόρφου της APOE. Υποστηρίζεται ότι η ACT σε συνδυασμό με την APOE πρωτεΐνη πιθανόν να επιταχύνουν τη μετατροπή των διαλυτών Αβ ινιδίων σε αδιάλυτα ινίδια. Ωστόσο, και πάλι από την βιβλιογραφία προκύπτουν αντιφατικά αποτελέσματα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε ανισορροπία σύνδεσης του αλληλομόρφου A του ACT πολυμορφισμού με άγνωστες λειτουργικές μεταλλάξεις του ACT γονιδίου.

Αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια του εγκεφάλου (CAA: Cerebral amyloid angiopathy): Σε ομάδα ασθενών με AD ανιχνεύτηκε μια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στη συχνότητα του αλληλομόρφου A (ACT-A) και τη σοβαρότητα της CAA(229). Σε μια άλλη μελέτη(230) η συχνότητα του T αλληλομόρφου (ACT-T) και του TT γονότυπου ήταν σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με CAA. Ωστόσο, η συσχέτιση αυτή δεν παρατηρήθηκε και σε ασθενείς με AD που ανέπτυξαν παράλληλα και αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια, πιθανόν λόγω της ύπαρξης διαφορετικών παθογενετικών μηχανισμών ανάμεσα στην AD και την CAA.

PD: Βρέθηκε μια συσχέτιση ανάμεσα στον γονότυπο AA του ACT πολυμορφισμού και την εκδήλωση της PD(231). Επιπλέον, η ηλικία έναρξης της νόσου ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε ασθενείς με ACT-AA γονότυπο σε σύγκριση με ασθενείς

που δεν είχαν αυτό το γονότυπο(232). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες προέκυψαν αντίθετα αποτελέσματα(233, 234).

Ατροφία πολλαπλών συστημάτων (MSA: Multiple system atrophy): Η συχνότητα του ACT-AA γονότυπου ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με MSA σε σύγκριση με τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου. Επίσης, στους ασθενείς με ACT-AA γονότυπο παρατηρήθηκε πιο πρόωμη ηλικία έναρξης της MSA, καθώς και πιο ραγδαία εξέλιξη της νόσου(213).

Εγκεφαλική αιμορραγία: Υπάρχει μια γενετική συσχέτιση ανάμεσα στον ACT-TT γονότυπο και την εκδήλωση της εγκεφαλικής αιμορραγίας, ιδιαίτερα σε ασθενείς με φυσιολογική αρτηριακή πίεση(235-237).

Υπαραχνοειδής αιμορραγία (SAH: Subarachnoid hemorrhage): Βρέθηκε ότι γονότυποι που εμπεριείχαν το T αλληλόμορφο αποτελούσαν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της ανευρυσματικής SAH(238).

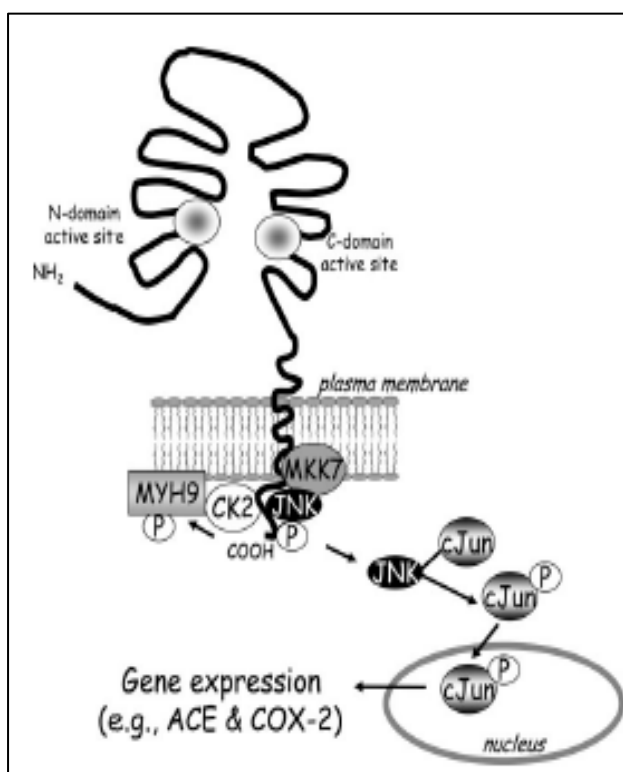
Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης (ACE)

Πρωτεΐνη και λειτουργία

Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης (ACE: Angiotensin converting enzyme) είναι μια μεταλλοπεπτιδάση ψευδαργύρου (Zn) που συναντάται στην επιφάνεια ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων, μονοκυττάρων, Τ-λεμφοκυττάρων, λείων μυϊκών ινών και λιποκυττάρων. Επίσης, υπάρχει και μια αρχέγονη μορφή του ACE που βρίσκεται αποκλειστικά στους όρχεις. Η διαλυτή μορφή του ACE (soluble or plasma ACE), προέρχεται από τη διάσπαση της μεμβρανικής μορφής με τη βοήθεια της ACE σεκρετάσης (ACE secretase), και συναντάται στον ορό, καθώς και σε άλλα υγρά του σώματος(239).

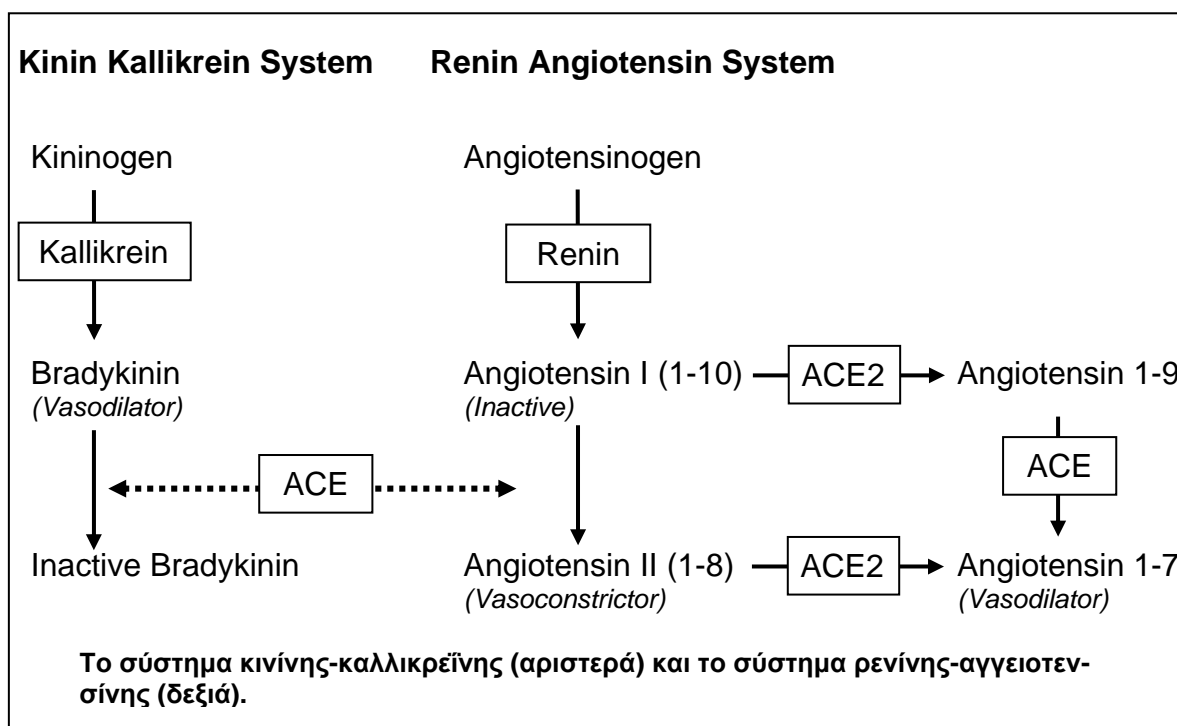
Η αρχέγονη μορφή του ACE (testicular ACE) διαθέτει ένα ενεργό κέντρο, του οποίου η κρυσταλλική δομή έχει δημοσιευθεί τα τελευταία χρόνια(240). Η σωματική μορφή του ACE (somatic ACE) είναι αποτέλεσμα γονιδιακού διπλασιασμού(241) και διαθέτει δύο ενεργά κέντρα, που καλούνται N- και C-περιοχές (N, C domains). Η τρισδιάστατη δομή της N-τελικής περιοχής δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Αντίθετα, η C-τελική περιοχή ταυτίζεται με την αντίστοιχη της αρχέγονης μορφής του ACE. Η λειτουργική δράση των δύο ενεργών κέντρων είναι διαφορετική, ενώ η μετατροπή της αγγιοτενσίνης I (Ang I) λαμβάνει χώρα στη C-τελική περιοχή. Ωστόσο, και τα δύο ενεργά κέντρα του ενζύμου συνεισφέρουν στη διάσπαση της βραδυκινίνης.

Η πρωτεΐνη του μετατρεπτικού ενζύμου



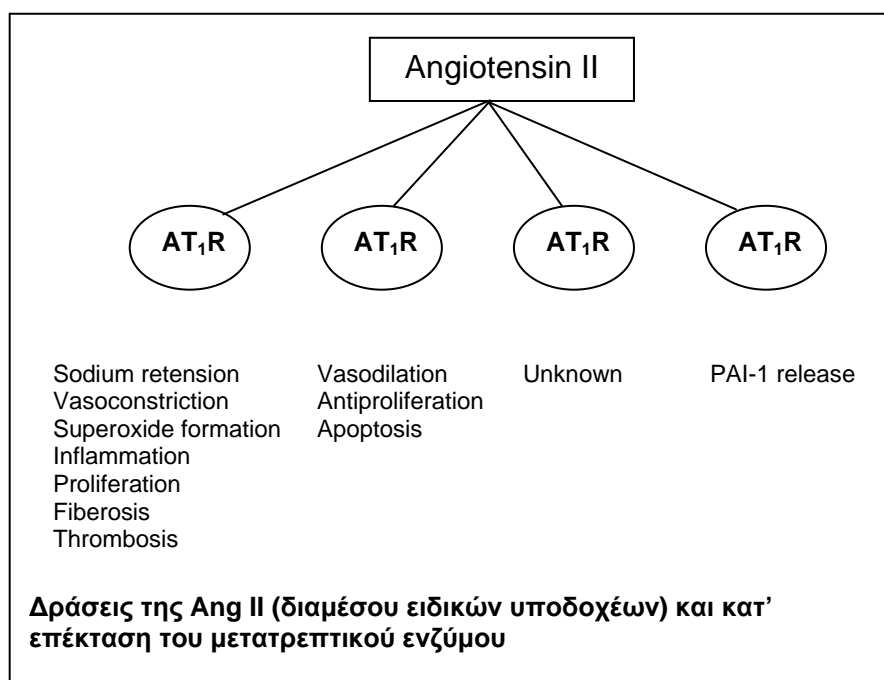
Οι δύο ομόλογες περιοχές, καθώς και το NH₂-τελικό άκρο της ACE πρωτεΐνης βρίσκονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον του κυττάρου. Η πρωτεΐνη συνδέεται στη μεμβράνη του κυττάρου και διαθέτει μια μικρή ενδοκυττάρια περιοχή στο HOOC-τελικό άκρο της.

Το ACE μετατρέπει το μη-ενεργό μόριο της Ang I (ή Ang1-10) στο ενεργό οκταπεπτιδίο της Ang II (ή Ang1-8). Η Ang II είναι το κύριο ενεργό προϊόν του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS: renin-angiotensin system)(242). Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης συμβάλλει στη μακροπρόθεσμη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, καθώς και του όγκου του αίματος στο σώμα. Η ρενίνη απελευθερώνεται από τα παρασπειραματικά κύτταρα των νεφρών. Στη σύνθεσή της συμβάλλουν διάφοροι παράγοντες, όπως η υψηλή συγκέντρωση άλατος, η απώλεια όγκου, ή η ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος. Η ρενίνη διασπά το μη-ενεργό πεπτιδίο του αγγειοτενσινογόνου, που συντίθεται στο ήπαρ, και παράγεται η Ang I, που είναι μια μη-ενεργή πρωτεΐνη των αγγείων. Στη συνέχεια, η Ang I μετατρέπεται στην Ang II μέσω της δράσης του ACE.



Η Ang II είναι ένας συσταλτικός παράγοντας των αγγείων. Επίσης, δρα στο φλοιό των επινεφριδίων, προκαλώντας την απελευθέρωση της αλδοστερόνης. Η αλδοστερόνη διεγείρει τα σωληνάρια των νεφρών, με αποτέλεσμα την επαναρρόφηση νατρίου και νερού από τα ούρα(243). Αυτό συνεπάγεται αύξηση στην ποσότητα υγρού στο αίμα, αναπληρώνοντας μια απώλεια όγκου, καθώς και αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Επίσης, η Ang II παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και

τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, επάγοντας τη σύνθεση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων(244). Τέλος, η Ang II πιθανόν να συμβάλλει στη δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, προκαλώντας τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του νιτρικού οξέος(245). Τα ευρήματα αυτά φανερώνουν τη δράση της Ang II στην παθοφυσιολογία του καρδιαγγειακού και δικαιολογούν τη μελέτη του ρόλου του RAS συστήματος στην αθηροσκλήρυνση, στα καρδιαγγειακά και αγγειακά εγκεφαλικά νοσήματα. Οι πολλαπλές δράσεις των πεπτιδίων αυτών φανερώνουν ότι το ACE πιθανόν να εμπλέκεται σε ποικίλες παθοφυσιολογικές διεργασίες καθώς και στα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια.



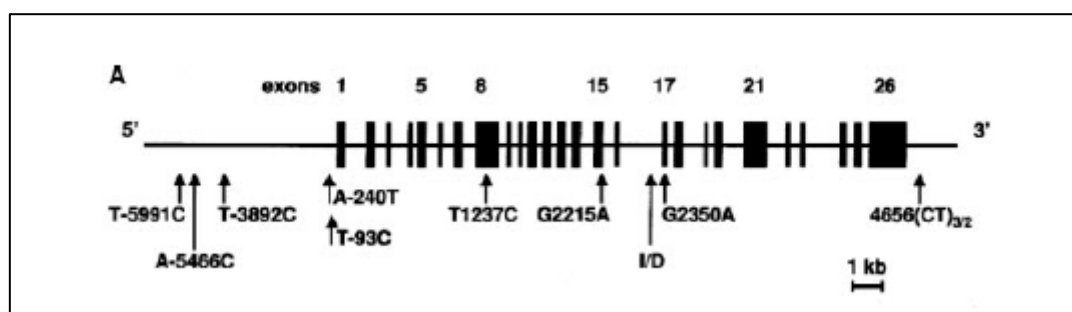
Το ACE παίζει σημαντικό ρόλο σ' ένα άλλο σύστημα ορμονών, που καλείται μονοπάτι κίνησης-καλλικρεΐνης (kinin-kallikrein cascade). Το ACE μεταβολίζει τη βραδυκινίνη, που είναι ένας διασταλτικός παράγοντας των αγγείων, και σχηματίζεται ο μη-ενεργός μεταβολίτης της βραδυκινίνης 1-5. Επομένως, και στο σύστημα κίνησης-καλλικρεΐνης το ACE ένζυμο συμβάλλει στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης.

Οι νευροκινίνες (neurokinins) είναι μια οικογένεια νευροδιαβιβαστών του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) που συμβάλλουν στη μεταβίβαση της αίσθησης του πόνου, τη ρύθμιση των συναισθημάτων, την μετατροπή των φλεγμονωδών και ανοσοποιητικών αποκρίσεων. Έχει βρεθεί ότι το ACE εμπλέκεται στη ρύθμιση των παραπάνω ουσιών(246, 247). Ωστόσο η μελέτη της δράσης του ACE στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι πάντοτε εφικτή in vivo(248). Παρ' όλα αυτά, ο ρόλος του ενζύμου αυτού έχει μελετηθεί σε διάφορες νευρολογικές παθήσεις, όπως η νόσος του Parkinson (PD)(249), η κατάθλιψη(250), και άλλες

συναισθηματικές διαταραχές(251). Ο ρόλος όμως του ACE στη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) δεν περιορίζεται μόνο σ' αυτούς τους νευροδιαβιβαστές. In vitro μελέτες φανερώνουν ότι το ACE ένζυμο διασπά το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς(252), που εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer (AD). Με τον τρόπο αυτό, υψηλά επίπεδα του ACE, πιθανόν να εμποδίζουν ή να μειώνουν το σχηματισμό γεροντικών πλακών, αποτρέποντας την εκδήλωση της AD.

Σε in vitro μελέτες εντός του εγκεφάλου, υψηλές συγκεντρώσεις του ACE έχουν βρεθεί στη μελανοραβδωτή οδό, καθώς και στα βασικά γάγγλια(253). Κύριες πηγές του συστηματικά κυκλοφορούντος ACE είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε αντίθεση το ACE των ιστών δεν είναι βέβαιο κατά πόσο συμβάλλει στο μεταβολισμό του αγγειοενεργού πεπτιδίου. Τα επίπεδα του ACE που βρίσκεται στο πλάσμα παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των ανθρώπων(254). Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επάγουν τη σύνθεση του συστηματικά κυκλοφορούντος ACE δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί. Ωστόσο, διάφορα νοσήματα του ΚΝΣ έχουν συσχετιστεί με αυξημένη δραστηριότητα του ACE. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες σε άτομα νεαρής ηλικίας φανερώνουν ότι η αυξημένη δράση του ACE σχετίζεται με υψηλή πιθανότητα για εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου(255). Ωστόσο, η δραστηριότητα του ACE δεν έχει μελετηθεί σε ισχαιμία του εγκεφάλου ή σε εγκεφαλική αιμορραγία. Επίσης, δεν έχουν δημοσιευθεί μετρήσεις της ACE δραστηριότητας κατά την οξεία φάση και τη φάση ανάρρωσης από ΑΕΕ. Τέλος, ο ρόλος του ACE στην αθηρωματική νόσο των εγκεφαλικών αγγείων δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί.

Το γονίδιο του ACE ενζύμου



Το γονίδιο του ACE ενζύμου

Το ανθρώπινο γονίδιο του ACE έχει χαρτογραφηθεί στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17q23). Το γονίδιο έχει μήκος 21 ζεύγη Kb και αποτελείται από 26 εξόνια και 25 ιντρόνια. Έχουν περιγραφεί περίπου 160 πολυμορφισμοί στο

γονίδιο του ACE ενζύμου, εκ των οποίων οι περισσότεροι είναι πολυμορφισμοί απλού νουκλεοτιδίου (SNPs: single nucleotide polymorphism). Επίσης, μόνο 34 από τους πολυμορφισμούς αυτούς εντοπίζονται στις κωδικοποιούσες περιοχές, ενώ 18 από αυτούς είναι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations), δηλαδή υπάρχει αντικατάσταση μιας μόνο βάσης του DNA, που οδηγεί σε κωδικόνιο ειδικό για διαφορετικό αμινοξύ.

Το γονίδιο κωδικοποιεί δύο ισομορφές του ACE: τη σωματική μορφή (somatic ACE), που έχει MB 170KDa και εκφράζεται στους διάφορους ιστούς του σώματος, και μια άλλη μορφή, με MB 100KDa, που εκφράζεται στα αρχέγονα κύτταρα των όρχεων (testicular ACE)(256). Δύο διαφορετικοί υποκινητές είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της έκφρασης των ισομορφών αυτών. Η σωματική μορφή του ACE ενζύμου (sACE) μεταγράφεται από έναν υποκινητή που βρίσκεται στο 5'-άκρο του πρώτου εξονίου, και οδηγεί στη μεταγραφή όλων των εξονίων. Στο ώριμο mRNA του sACE ενζύμου όλα τα εξόνια (1-26) μεταγράφονται, με εξαίρεση το εξόνιο 13 που απομακρύνεται με τη διαδικασία του ματίσματος (splicing). Η άλλη ισομορφή του ACE ενζύμου (tACE) μεταγράφεται από έναν υποκινητή, που αποτελείται από 91bp και βρίσκεται στο ιντρόνιο 12. Το mRNA του tACE ενζύμου περιλαμβάνει τα εξόνια 13-26. Το sACE ένζυμο διαθέτει δύο ενεργά κέντρα (N- και C- περιοχές), ενώ το tACE ένζυμο αποτελείται από ένα μόνο ενεργό κέντρο. Η τρισδιάστατη δομή του ενεργού κέντρου του tACE ενζύμου είναι όμοια με την αντίστοιχη του C-τελικού τμήματος του sACE ενζύμου. Ο ακριβής ρόλος του tACE ενζύμου δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Ωστόσο, πιθανόν να συμβάλλει στην αναπαραγωγική λειτουργία. Η τρισδιάστατη δομή του γονιδίου του ACE ενζύμου πιθανόν να προέρχεται από το διπλασιασμό ενός προγονικού γονιδίου. Τα εξόνια 4-11 και 17-24, που κωδικοποιούν δύο ομόλογες περιοχές του ACE ενζύμου, είναι παρόμοια στο μέγεθος και την αλληλουχία των βάσεων τους(257).

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ACE ΕΝΖΥΜΟΥ

Έχει περιγραφεί(258) ένας πολυμορφισμός στο ιντρόνιο 16 του ανθρώπινου γονιδίου του ACE ενζύμου, και οφείλεται στην παρουσία (insertion, I) ή την απουσία (deletion, D) ενός τμήματος 287bp (NCBI ref. SNP ID: rs1799752). Στη μελέτη αυτή, τα επίπεδα παραγωγής του ACE ενζύμου ήταν περίπου διπλάσια στα άτομα με II γονότυπο σε σχέση με τους DD ομοζυγώτες. Επίσης, η παραγωγή του ACE ενζύμου στους ετεροζυγώτες (ID γονότυπος) βρισκόταν σ' ένα ενδιάμεσο επίπεδο, γεγονός που φανερώνει μια συνυπεροχή των δύο αλληλομόρφων. Σ' αυτή τη μελέτη ο I/D πολυμορφισμός βρέθηκε ότι είναι υπεύθυνος περίπου για το 47% της

παρατηρούμενης διακύμανσης στα επίπεδα παραγωγής του ACE ενζύμου. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι ο I/D πολυμορφισμός παίζει σημαντικό ρόλο στα επίπεδα έκφρασης του ACE ενζύμου τόσο στο πλάσμα, όσο και στους ιστούς(259, 260).

Σε πειραματική μελέτη ανδρών με φυσιολογική αρτηριακή πίεση(261), κατά τη χορήγηση Ang I, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα παραγωγής της Ang II στη φλεβική κυκλοφορία καθώς και η αρτηριακή πίεση ήταν υψηλότερα στα άτομα με DD γονότυπο σε σχέση με τους II ομοζυγώτες.

In vivo μελέτες(262) φανερώνουν ότι ο I/D πολυμορφισμός επηρεάζει και μια άλλη λειτουργία του ACE ενζύμου, το μεταβολισμό της βραδυκινίνης (BK). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των D αλληλομόρφων και της συγκέντρωσης της BK1-5 (το ανενεργό προϊόν), και της αναλογίας BK1-5/βραδυκινίνη.

Από τις παραπάνω μελέτες φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη λειτουργία του ACE. Επιπλέον, ο I/D πολυμορφισμός έχει εκτεταμένα μελετηθεί σε μια σειρά νοσημάτων. Ωστόσο, το γεγονός ότι εντοπίζεται σε μη-κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου καθιστά λιγότερο πιθανό το ενδεχόμενο να πρόκειται για έναν λειτουργικό πολυμορφισμό. Παρά τις εκτενείς έρευνες η ακριβής θέση του λειτουργικού πολυμορφισμού στο γονίδιο του ACE ενζύμου δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί(263).

Νεότερες μελέτες φανερώνουν ότι μια άλλη γονιδιακή περιοχή και συγκεκριμένα στο χρωμόσωμα 4 έχει συσχετιστεί με τα επίπεδα παραγωγής του ACE στο πλάσμα(264). Σε περίπτωση που η περιοχή αυτή αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο ρύθμισης της δράσης του ACE ενζύμου, τότε πιθανόν να διαλευκανθούν μερικά παράδοξα αποτελέσματα για τη σχέση μεταξύ του ACE γονιδίου, της δράσης του ACE ενζύμου και της έκβασης μετά από ποικίλα νοσήματα. Επίσης, θα είναι δυνατή η ανάπτυξη εναλλακτικών μορφών προφύλαξης και θεραπείας.

Συσχετίσεις του I/D πολυμορφισμού στο ACE γονίδιο με διάφορες νόσους

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως η φύση και η περιοχή εντόπισης του λειτουργικού πολυμορφισμού, ή πολυμορφισμών, που επηρεάζει τα επίπεδα παραγωγής του ACE στο πλάσμα δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί. Ωστόσο, μελέτες σε διάφορους πληθυσμούς φανερώνουν ότι οι περισσότεροι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στο γονίδιο του ACE συνδέονται άμεσα με τον I/D πολυμορφισμό. Με τον τρόπο αυτό, ο I/D πολυμορφισμός αποτελεί έναν σημαντικό δείκτη για τη μελέτη

σύνδεσης του άγνωστου λειτουργικού πολυμορφισμού (ων) με τις παθοφυσιολογικές αλλοιώσεις.

Σε μια σειρά εργασιών έχει μελετηθεί η συσχέτιση του I/D πολυμορφισμού με την έκβαση των ασθενών μετά από ποικίλα νοσήματα. Οι μελέτες αυτές περιλαμβάνουν επιπλέον πληροφορίες που αφορούν τη συχνότητα εκδήλωσης των διάφορων νοσημάτων και την προοδευτική εξέλιξή τους, την επιμέρους συμπτωματολογία, την αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής αγωγής, την αλληλεπίδραση με άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, το ρυθμό ανάρρωσης των ασθενών μετά τις νόσους και τη δυνατότητα επιβίωσής τους. Φαίνεται ότι ο I/D πολυμορφισμός, εμπλέκεται σε διάφορα παθοφυσιολογικά γεγονότα, πιθανόν μέσω των συστημάτων ρενίνης-αγγειοτενσίνης και κίνινης-καλλικρεΐνης.

I/D πολυμορφισμός και αρτηριακή πίεση

Κατά τη διερεύνηση της συσχέτισης αυτής σε διάφορα πειραματικά μοντέλα έχουν προκύψει αντιφατικά αποτελέσματα. Δύο πιο πρόσφατες μετά-αναλύσεις δεν επιβεβαιώνουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ I/D πολυμορφισμού και αρτηριακής πίεσης(265, 266).

Η σχέση της λειτουργίας του ACE γονιδίου με την αρτηριακή πίεση διερευνήθηκε σε πληθυσμούς ποντικών που διέθεταν 1,2 ή 3 λειτουργικά αντίγραφα του γονιδίου στη φυσιολογική περιοχή εντόπισής του στο χρωμόσωμα 17(267). Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι αν και η δραστηριότητα του ACE ενζύμου στον ορό των ποντικών αυξανόταν προοδευτικά και ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου που περιείχαν, ωστόσο η αρτηριακή πίεση δεν παρουσίαζε σημαντικές διακυμάνσεις. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του ACE θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αρτηριακή πίεση, μόνο στην περίπτωση ύπαρξης επιπρόσθετων περιβαλλοντικών ή γενετικών παραγόντων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της δράσης του αλληλομόρφου D στην εκδήλωση της υπέρτασης είναι αμελητέα.

I/D πολυμορφισμός και Αθηροσκλήρυνση

Υπάρχει πληθώρα μελετών για το ρόλο του ACE I/D πολυμορφισμού στην αθηροσκλήρωση των καρωτίδων. Η διερεύνηση της συσχέτισης αυτής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μετρήσεων της πάχυνσης του έσω και μέσου χιτώνα της καρωτίδας (carotid IMT:carotid artery intima media thickness). Σε μια μετά-ανάλυση επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του D αλληλομόρφου και αυξημένων IMT μετρήσεων της καρωτίδας(268).

Η συσχέτιση του I/D πολυμορφισμού με την εμφάνιση αθηροσκλήρυνσης εκτιμήθηκε επίσης με τη χρήση στεφανιαίας αποπιάνωσης, που αποτελεί δείκτη της στεφανιαίας αθηροσκλήρυνσης(269), καθώς και με παθολογοανατομικές μετρήσεις της αορτικής αθηροσκλήρυνσης(270). Όμως, τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν αντιφατικά. Γενικά, αναμένεται μια μέτρια θετική συσχέτιση του αλληλομόρφου D με την εκδήλωση αθηροσκλήρυνσης, κυρίως στους φορείς επιπρόσθετων (γενετικών ή περιβαλλοντικών) καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου.

I/D πολυμορφισμός, Στεφανιαία νόσος και Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο

Κατά τη διερεύνηση της συσχέτισης του I/D πολυμορφισμού με την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου και ισχαιμικού ΑΕΕ προέκυψαν αντιφατικά αποτελέσματα. Επομένως, η επίδραση του ACE γονιδίου στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων νοσημάτων είναι σχετικά μικρή.

I/D πολυμορφισμός και Νόσος του Alzheimer

In vitro μελέτες φανερώνουν ότι το ACE ένζυμο διασπά το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς, που εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer (AD)(252). Έτσι, υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης του ACE ενζύμου, πιθανόν να αποτρέπουν την εκδήλωση της νόσου in vivo. Μια πρόσφατη μετά-ανάλυση επιβεβαιώνει την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του I αλληλομόρφου του ACE γονιδίου και της AD(271).

Ιντερλευκίνες 1α, 1β και 1Ra (IL-1α, IL-1β, IL- Ra)

IL-1α και IL-1β πρωτεΐνες

Η οικογένεια της IL-1 αποτελείται από 3 γονίδια που κωδικοποιούν για 3 ξεχωριστές πρωτεΐνες: η IL-1α και η IL-1β είναι αγωνιστές και η IL-1Ra (IL-1 Receptor antagonist) είναι ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1. Η IL-1α και η IL-1β συντίθενται ως ανενεργά πρόδρομα μόρια χωρίς αλληλουχίες οδηγού. Το MB κάθε προδρόμου μορίου είναι 31KD. Οι βιολογικά ενεργές μορφές των προδρόμων αυτών μορίων έχουν MB 17KD και σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικών κυτταρικών πρωτεασών. Αντίθετα, μια από τις ισομορφές της IL-1Ra (secreted IL-1Ra: sIL-1Ra) περιέχει πεπτιδίο σήματος και εκκρίνεται από τα κύτταρα αμέσως μετά την παραγωγή της.

Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων της IL-1 (IL-1R): ο υποδοχέας τύπου I (IL-1RI) που παράγει ενδοκυττάριο σήμα, και ο υποδοχέας τύπου II (IL-1RII) που αλληλεπιδρά με την IL-1 χωρίς όμως τη μεταγωγή ενδοκυττάρια σήματος. Με την πρόσδεση της IL-1 στον υποδοχέα τύπου I σχηματίζεται ένα σύμπλοκο, το οποίο συνδέεται με την AcP (IL-1R-accessory protein)(272). Ο ετεροδιμερισμός των κυτταροπλασματικών περιοχών του IL-1RI υποδοχέα και του συμπλόκου IL-1R-AcP συμβάλλουν στη μεταγωγή ενδοκυττάρια σήματος. Οι εξωκυτταρίες ή διαλυτές περιοχές των υποδοχέων IL-1RI (IL-1sRI) και IL-1RII (IL-1sRII) συνδέονται με την IL-1α, την IL-1β ή την IL-1Ra.

IL-1α

Γονιδιακή έκφραση της IL-1α

Η έκφραση του γονιδίου της IL-1α για την παραγωγή της πρωτεΐνης περιλαμβάνει τη μεταγραφή μιας περιοχής 4.2 ζευγών Kb που βρίσκεται ανοδικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής και μιας περιοχής 200bp που κωδικοποιεί για τον υποκινητή του γονιδίου(273).

Παραγωγή της IL-1α

Η βιολογικά ενεργή μορφή της IL-1α είναι ένα καρβοξυτελικό πεπτιδίο MB 17KD. Το ανενεργό πρόδρομο μόριο της IL-1α (proIL-1α) έχει MB 31KD και συντίθεται με τη βοήθεια κυτταροσκελετικών δομών (μικροσωληνίσκοι), σε αντίθεση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο(274). Η proIL-1α παραμένει ενδοκυττάρια, σε αντίθεση με ένα σημαντικό ποσοστό της proIL-1β που διασπάται με τη βοήθεια μιας εξειδικευμένης, ενδοκυττάριας πρωτεάσης και εκκρίνεται από τα κύτταρα. Όταν επέρχεται κυτταρικός θάνατος, η proIL-1α απελευθερώνεται από το κύτταρο και διασπάται από εξωκυτταρίες πρωτεάσες(275).

Επίσης, η proIL-1α διασπάται από πρωτεάσες κυστεΐνης που καλούνται καλπεΐνες (calcium-dependent, membrane-associated cysteine proteases-calpains)(276, 277). Η παρουσία αυξημένων ιόντων Ca^{2+} επάγει την ενεργοποίηση της καλπεΐνης, η οποία διασπά το πρόδρομο μόριο της IL-1α. Τέλος, η εξωκυττάρια έκκριση του ενεργού μορίου της IL-1α λαμβάνει χώρα και απουσία κυτταρικού θανάτου(278).

Ενδοκυττάρια IL-1α

Η proIL-1α παραμένει στο εσωτερικό του κυττάρου αμέσως μετά την παραγωγή της, λόγω απουσίας του πεπτιδίου οδηγού. Ωστόσο, δεν παρατηρείται αισθητή συσσώρευση IL-1 σε κάποιο εξειδικευμένο οργανίδιο του κυττάρου. Η συγκέντρωση της IL-1α αυξάνεται στην κυκλοφορία του αίματος ή στα υγρά του σώματος μόνο κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η αυξημένη συγκέντρωση της κυτοκίνης οφείλεται στην απελευθέρωσή της από τα κύτταρα λόγω απόπτωσης ή στην πρωτεόλυσή της μέσω καλπεϊνών(278).

Μεμβρανική IL-1α

In vitro μελέτες φανερώνουν ότι ένα ποσοστό της proIL-1α συναντάται στην επιφάνεια πολλών κυττάρων, κυρίως σε μονοκύτταρα και Β-λεμφοκύτταρα. Περίπου το 10-15% της IL-1α συνδέεται με μεθύλια(279) και μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια(280). Η διαδικασία αυτή γίνεται σε ειδικά κατάλοιπα λυσίνης διευκολύνει τη μεταφορά του μορίου στην επιφάνεια του κυττάρου. Η μεμβρανική IL-1α είναι ένα βιολογικά ενεργό μόριο και προσκολλάται στη μεμβράνη του κυττάρου με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται λεκτίνη, καθώς και καταλοίπων μαννόζης(281). Η βιολογική δραστηριότητα της μεμβρανικής IL-1α αναστέλλεται παρουσία αντισωμάτων για την IL-1α (anti-IL-1α). Ωστόσο, αντισώματα που εμποδίζουν τη δράση της IL-1β (anti-IL-1β) δεν αναστέλλουν τη δραστηριότητα της μεμβρανικής IL-1α.

IL-1β

Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ IL-1α και IL-1β

Οι τρισδιάστατες δομές των δύο αγωνιστών είναι όμοιες και αποτελούνται από β φύλλα(282, 283). Και τα δύο μόρια συντίθενται στο κυτταρόλυμα (τα μη κοκκώδη συστατικά του κυτταροπλάσματος) με τη βοήθεια κυτταροσκελετικών δομών (μικροσωληνίσκοι) και όχι του ενδοπλασματικού δικτύου(274, 284). Τα ανενεργά πρόδρομα μόρια των δύο αγωνιστών υφίστανται μεθυλίωση σε ειδικά κατάλοιπα λυσίνης(279). Ωστόσο, οι δύο κυτοκίνες διαφέρουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, τη σταθερότητα του mRNA, τη μετάφραση, την περαιτέρω

επεξεργασία, την έκκριση. Επιπλέον, η συγγένεια σύνδεσης του προδρόμου και ώριμου μορίου της IL-1β με τους υποδοχείς της IL-1 είναι διαφορετική από τα αντίστοιχα μόρια της IL-1α. Καθώς το ώριμο μόριο της IL-1β εκκρίνεται από τα κύτταρα προσδένεται με μεγαλύτερη δύναμη σύνδεσης στο διαλυτό υποδοχέα τύπου II. Με τη σύνθεσή της η IL-1β εκκρίνεται από τα κύτταρα, ενώ η IL-1α είναι ένας ρυθμιστής των ενδοκυττάρων γεγονότων και παίζει σημαντικό ρόλο στην περιοχή της φλεγμονής.

Γονιδιακή έκφραση της IL-1β

Οι ρυθμιστικές περιοχές της IL-1β εντοπίζονται κυρίως ανοδικά αλλά και καθοδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Τα επίπεδα του mRNA της IL-1β αυξάνονται ραγδαία εντός 15min, κατά τη διάρκεια παθολογικών γεγονότων, και μειώνονται μετά από 4 ώρες. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη σύνθεση κάποιου μεταγραφικού καταστολέα και/ή στη μείωση του χρόνου ημιζωής του mRNA(285, 286). Η παρουσία IL-1 στο εσωτερικό του κυττάρου διατηρεί υψηλά τα επίπεδα του mRNA της IL-1β για 24 ώρες(287, 288).

Επεξεργασία και έκκριση

Μετά τη σύνθεσή της, η proIL-1β παραμένει κυρίως στο εσωτερικό του κυττάρου, μέχρι να διασπαστεί από το ένζυμο ICE (IL-1β converting enzyme). Μετά τη διάσπαση παράγεται το ώριμο μόριο της IL-1β, το οποίο μεταφέρεται στο εξωτερικό του κυττάρου. Το πρόδρομο μόριο της IL-1β (aa 1-116) συνδέεται με μεθύλια σε κατάλοιπα λυσίνης(279). Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί μεμβρανικές μορφές proIL-1β, ενώ μελέτες φανερώνουν ότι το πρόδρομο μόριο της IL-1β είναι βιολογικά ενεργό στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου(289). Μικρές συγκεντρώσεις IL-1β έχουν βρεθεί στα λυσοσώματα(290) και στους μικροσωληνίσκους(274), που πιθανόν παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκκριση του ώριμου μορίου της IL-1β. Ωστόσο, η μετατροπή της proIL-1β σε IL-1β απαιτεί τη διάσπαση του προδρόμου μορίου μεταξύ των αμινοξέων 116-117 (asp-ala) από το ICE ένζυμο(291).

Ρύθμιση της παραγωγής της IL-1β

Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση της IL-1β, όπως η πολυπλοκότητα του υποκινητή του γονιδίου, η ρύθμιση των διαδικασιών ματίσματος του mRNA (splicing), η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών που απαιτούνται για τη μετάφραση του mRNA, και η σταθερότητα της 3' μη-μεταφραζόμενης περιοχής.

ICE (IL-1β converting enzyme)

Πρόκειται για μια εξειδικευμένη, ενδοκυττάρια πρωτεάση κυστεΐνης(291) που διασπά το πρόδρομο μόριο της IL-1β στη θέση 116-117 της αλληλουχίας των αμινοξέων (asp –ala), με αποτέλεσμα την παραγωγή του N-τελικού, ώριμου μορίου της IL-1β.

IL-1 Receptors

Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων που αλληλεπιδρούν με την IL-1: ο υποδοχέας τύπου I (IL-1RI) και ο υποδοχέας τύπου II (IL-1RII). Και οι δύο τύποι των υποδοχέων είναι μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig) και διαθέτουν 3 περιοχές στα εξωκυττάρια τμήματά τους, που εμφανίζουν σημαντική ομολογία(272, 292, 293). Στον άνθρωπο, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τους υποδοχείς IL-1RI και IL-1RII έχουν χαρτογραφηθεί στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 2(294).

Το γονίδιο της IL-1

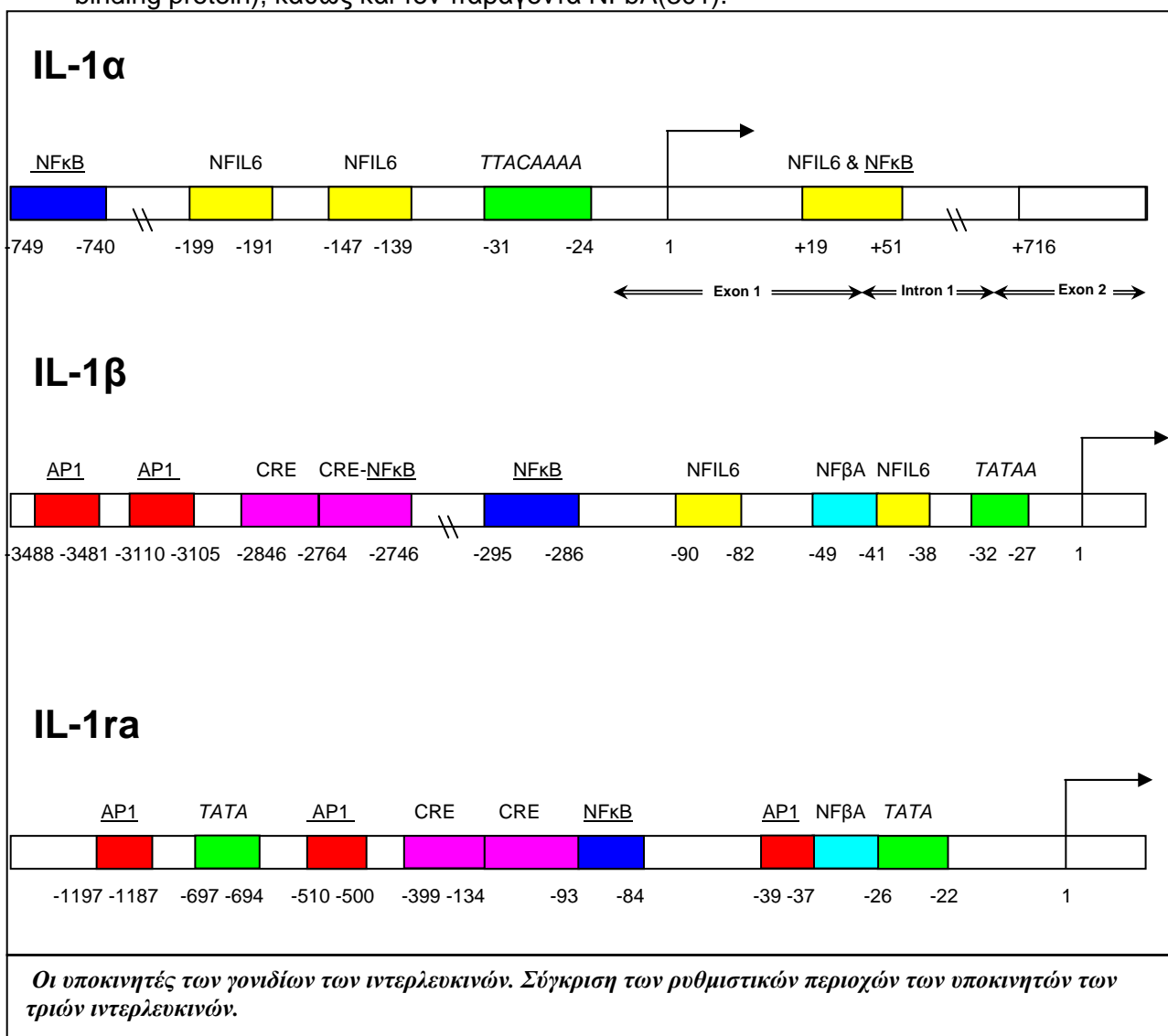
Η κλωνοποίηση και η εύρεση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδίου της IL-1β(295) επιτεύχθηκε το 1984. Έχει δημοσιευθεί ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδιώματος της ανθρώπινης IL-1α(296) και της IL-1β(297). Στον άνθρωπο, το γονίδιο της IL-1α έχει μήκος περίπου 10 ζεύγη Kb, ενώ το γονίδιο της IL-1β είναι περίπου 7 ζεύγη Kb. Τα ανθρώπινα γονίδια της IL-1 έχουν χαρτογραφηθεί στην ίδια περιοχή του χρωμοσώματος 2 (2q13)(298). Στον άνθρωπο, τα γονίδια της IL-1α και της IL-1β διαφέρουν στην αλληλουχία των εξονίων τους. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι η τρισδιάστατη διαμόρφωση των αντίστοιχων ιντρονίων και εξονίων παρουσιάζει υψηλή ομολογία(297).

Τα γονίδια της IL-1α και της IL-1β αποτελούνται από 7 εξόνια. Το πρώτο εξόνιο περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό του 5'μη-μεταφραζόμενου mRNA που κωδικοποιεί για τις αλληλουχίες οδηγού. Επίσης, μια πολύ καλά διατηρημένη σειρά ομοπουρινών βρίσκεται εντός του πρώτου ιντρονίου του γονιδίου της IL-1. Επιπρόσθετες αλληλουχίες εντός το πρώτου ιντρονίου του ανθρώπινου γονιδίου της IL-1β επιδρούν στην έκφραση του γονιδίου(299). Στον άνθρωπο, το τέταρτο ιντρόνιο του γονιδίου της IL-1α, καθώς και το τρίτο ιντρόνιο του γονιδίου της IL-1β περιέχουν στοιχεία με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (repetitive sequence elements), που είναι μέλη της Alu οικογένειας. Το έκτο ιντρόνιο του ανθρώπινου γονιδίου της IL-1α και το πέμπτο ιντρόνιο του ανθρώπινου γονιδίου της IL-1β περιέχουν αλληλουχίες που είναι ομόλογες με την αντίστοιχη του στοιχείου GRE (glucocorticoid response element) (TGTYCT). Ωστόσο, ο ρόλος των αλληλουχιών αυτών στην καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου της IL-1 δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Το έβδομο εξόνιο και των δύο γονιδίων περιέχει τις 3'μη-μεταφραζόμενες αλληλουχίες (3'UTR), καθώς

και τις καρβόξυ-τελικές αλληλουχίες της κωδικοποιούσας περιοχής. Η 3'UTR περιοχή των γονιδίων της IL-1α και της IL-1β περιέχει αλληλουχίες πλούσιες σε AU, καθώς και πολλά αντίγραφα του ΑΤΤΤΑ μοτίβου. Έχει βρεθεί ότι οι αλληλουχίες αυτές συμβάλλουν στην αποσταθεροποίηση της αντίστοιχης κυτοκίνης, καθώς και των mRNAs που κωδικοποιούν για κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια(300).

Υποκινητές του γονιδίου της IL-1

Η διαμόρφωση των υποκινητών των τριών γονιδίων της IL-1 είναι διαφορετική, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Ο υποκινητής του γονιδίου της IL-1α δε διαθέτει κιβώτιο TATA (TATA box motif), σε αντίθεση με τους υποκινητές των γονιδίων της IL-1β και της IL-1Ra. Και οι τρεις υποκινητές του γονιδίου της IL-1 περιέχουν ρυθμιστικά στοιχεία του παράγοντα NFκB, ενώ μόνο εκείνοι των γονιδίων της IL-1α και της IL-1β διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα NF-IL6. Τέλος, οι υποκινητές των γονιδίων της IL-1β και της IL-1Ra διαθέτουν θέσεις σύνδεσης για τις AP1 πρωτεΐνες, τον παράγοντα CREB (cAMP response element binding protein), καθώς και τον παράγοντα NFβA(301).



Λειτουργικοί πολυμορφισμοί στο ανθρώπινο γονίδιο της IL-1

Στον υποκινητή (promoter) του γονιδίου της IL-1β και στη θέση -511 έχει περιγραφεί ένας C/T πολυμορφισμός απλού νουκλεοτιδίου (SNP, single nucleotide polymorphism)(302). Ο πολυμορφισμός αυτός είναι λειτουργικός και έχει συσχετισθεί με πληθώρα νοσημάτων. Υπάρχουν όμως αντικρουόμενα ευρήματα για την επίδραση του πολυμορφισμού στην έκκριση της IL-1β(303-305). Στις περισσότερες όμως μελέτες το αλληλόμορφο 2 αντιπροσωπεύει ένα φαινότυπο υπερέκκρισης της IL-1β.

IL-1B-511*1

- ✓ Έμφραγμα μυοκαρδίου(306)
- ✓ Ατροφία πολλαπλών συστημάτων(307)
- ✓ Σοβαρότητα σκλήρυνσης κατά πλάκας(308)
- ✓ Νόσο Parkinson(309) και πρόωμη έναρξη της νόσου(310).
- ✓ Ψωρίαση(311)
- ✓ Σχιζοφρένεια(312)
- ✓ Ψυχικά συμπτώματα σε ασθενείς με νόσο Alzheimer(313)

IL-1B-511*2

- ✓ Σοβαρότητα ελκώδους κολίτιδας(314).
- ✓ Συστηματικό ερυθματώδη λύκο(315)
- ✓ Σύνδρομο Sjogren(316).
- ✓ Πυρετικοί σπασμοί σε παιδιά(317).
- ✓ Επιληψία κροταφικού λοβού και σκλήρυνση ιπποκάμπου(318)
- ✓ Νόσο Parkinson(319, 320)
- ✓ Προστατεύει από επαναστένωση των στεφανιαίων μετά από διαδερμική αγγειοπλαστική(321)

Μερικές από τις συσχετίσεις του πολυμορφισμού IL-1β (-511 C/T)

Όσον αφορά το γονίδιο της IL-1α στη θέση -889 του υποκινητή έχει εκτεταμένα μελετηθεί ένας C/T πολυμορφισμός απλού νουκλεοτιδίου και έχει συσχετισθεί με ποικίλα νοσήματα τα οποία εμπλέκουν φλεγμονώδεις μηχανισμούς(322). Μελέτες έχουν δείξει σε ασθενείς με σοβαρή περιοδοντίτιδα ότι φορείς του αλληλομόρφου 2 της IL-1α (-889) έχουν αυξημένα επίπεδα της IL-1α στα φαινότυπα(323), ενώ φυσιολογικοί μάρτυρες οι οποίοι είναι 2/2 ομοζυγώτες, αντιπροσωπεύουν ένα φαινότυπο αυξημένης έκκρισης της IL-1β(324). Παρ' όλα αυτά

η λειτουργικότητα του συγκεκριμένου πολυμορφισμού έχει αμφισβητηθεί. Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η μεταγραφή του γονιδίου εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από ένα τμήμα στην ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου μεταξύ -92 και -82, ενώ δεν αναγνωρίστηκε δραστηριότητα του υποκινητή στην περιοχή -889(325). Επιπλέον έχει περιγραφεί ένας πολυμορφισμός απλού νουκλεοτιδίου στο πέμπτο εξόνιο, στην περιοχή +4845 ο οποίος επηρεάζει την περιοχή διάσπασης της pro-IL-1α σε IL-1α. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον IL-1α (-889) πολυμορφισμό και έχει βρεθεί ότι τα IL-1α(-889)*2 (που συνήθως είναι και IL-1α(+4845)*2) ομόζυγα κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση πρωτεΐνης IL-1α (325).

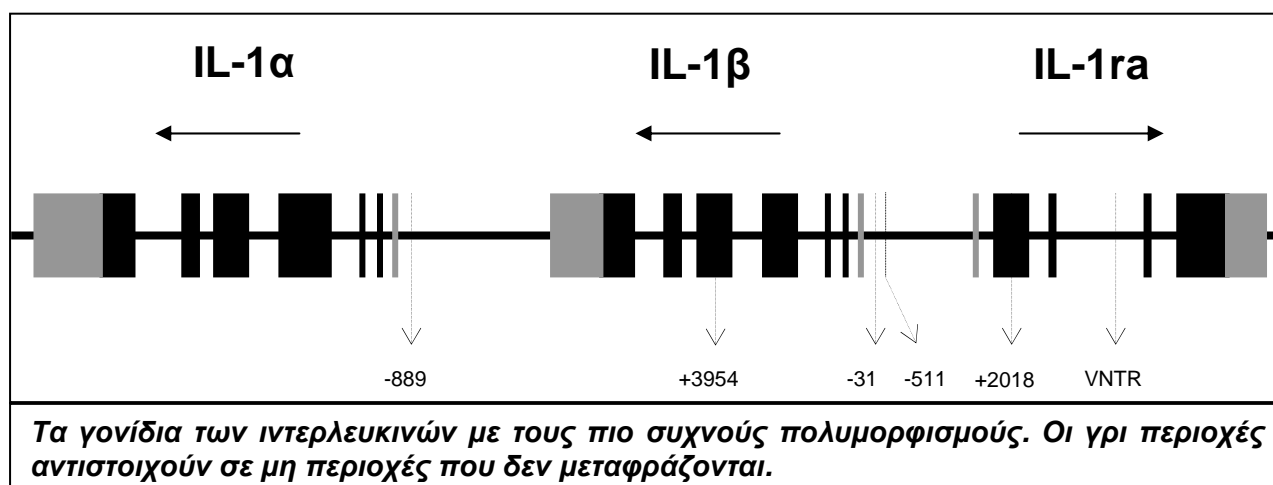
IL-1A-889*1

- ✓ Συστηματικό ερυθματώδη λύκο(315)
- ✓ Νόσο Αδαμαντιάδη-Behcet(326)
- ✓ Σαρκοείδωση(327)
- ✓ Ψωριασική αρθρίτιδα(328)
- ✓ Πρώιμη έναρξη βαρείας μυασθένειας(329)

IL-1A-889*2

- ✓ Πρώιμη έναρξη της νόσου Alzheimer(330)
- ✓ Ισχαιμικό ΑΕΕ(331)
- ✓ Συστηματική σκλήρυνση(332)
- ✓ Ατροφία πολλαπλών συστημάτων(333)
- ✓ Νεανική ρευματοειδή αρθρίτιδα(322)

Μερικές από τις συσχετίσεις του πολυμορφισμού IL-1α (-889 C/T)



Δράσεις της IL-1 στα νευρικά κύτταρα

Ενδείξεις συμμετοχής της IL-1 στην εγκεφαλική βλάβη

Μεγάλο είναι το ενδιαφέρον των μελετητών για τη συμβολή των ιντερλευκινών στην οξεία και χρόνια νευρωνική εκφύλιση μετά από διαφόρων ειδών βλάβες του εγκεφαλικού παρεγχύματος όπως ισχαιμία, αιμορραγία, μηχανική ή τοξική εγκεφαλική κάκωση. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η IL-1 αυξάνει την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης, τον θάνατο και την απόπτωση των νευρικών κυττάρων.

Η έκφραση της IL-1 και της IL-1ra στον εγκεφαλικό ιστό αυξάνεται μετά από κάκωση(334) και αιμορραγία(335). Ενώ όμως υπάρχει άμεση υπερ-έκφραση της IL-1 κατά τη διάρκεια της πρώιμης περιόδου μετά την μηχανική κάκωση (mRNA μετάγραφα εντός 15min και πρωτεΐνη εντός 1h) (336) στην ενδοεγκεφαλική αιμορραγία παρατηρείται καθυστέρηση στην επαγωγή των ιντερλευκινών(337). Επίσης, σε κλινικές μελέτες ασθενών που υπέστησαν κρανιοεγκεφαλική κάκωση ή εγκεφαλικό επεισόδιο παρατηρείται αυξημένη έκφραση IL-1 στο ENY ή τον εγκεφαλικό ιστό μετά το θάνατό τους(334). Σε πολλές περιπτώσεις τα αυξημένα επίπεδα της IL-1 σχετίζονται με την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης και την κλινική έκβαση των ασθενών(338).

Έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση IL-1 σε πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν εγκεφαλική κάκωση επιδεινώνει δραματικά την εγκεφαλική βλάβη(339). Επίσης, η χορήγηση αντισωμάτων που αναστέλλουν τη δράση της IL-1β ή αναστολέων της ICE (IL-1β converting enzyme)(340) που εμποδίζουν τη διάσπαση της IL-1β προκαλούν σημαντική μείωση του εγκεφαλικού οιδήματος, του μεγέθους της βλάβης καθώς και του αριθμού των νευρικών κυττάρων που υφίστανται απόπτωση(341).

Η ακριβής κυτταρική πηγή της IL-1β μετά από εγκεφαλική βλάβη δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Ωστόσο, κύριες πηγές(342) της θεωρούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η μικρογλοία, και τα μακροφάγα/μονοκύτταρα. Επίσης, μερικές μελέτες αναφέρουν ότι οι νευρώνες, τα αστροκύτταρα καθώς και τα ολιγοδεντροκύτταρα(343) εκφράζουν IL-1β μετά από εγκεφαλική βλάβη.

Η IL-1α έχει παρόμοια δομή και δράση με την IL-1β με τη διαφορά ότι η IL-1β εκκρίνεται από τα κύτταρα και γι' αυτό έχει επιπλέον και συστηματική δράση, ενώ η IL-1α είναι ενδοκυττάρια ή συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη και είναι μεσολαβητής της τοπικής φλεγμονής(339). Η έκφραση της μετά από εγκεφαλική βλάβη συμβαδίζει με αυτή της IL-1β αν και η IL-1β επάγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες(344, 345). Κύριες πηγές της IL-1α όπως και της IL-1β στον εγκέφαλο της θεωρούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η μικρογλοία, τα μακροφάγα και οι νευρώνες(342). Χορήγηση της IL-1α επιδεινώνει την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης

και τον θάνατο των νευρικών κυττάρων(344, 345). Είναι αξιοσημείωτο ότι για τη μείωση της εγκεφαλικής βλάβης και την καταστολή της φλεγμονώδους αντίδρασης δεν επαρκεί μόνο η αναστολή της IL-1β. Σε διαγονιδιακά ποντίκια παρατηρήθηκε δραματική μείωση της εγκεφαλικής βλάβης όταν υπήρχε έλλειψη και των δύο γονιδίων, το οποίο δεν συνέβαινε όταν απουσίαζε μόνο το ένα γονίδιο(346).

Από την άλλη πλευρά, πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η IL-1ra μειώνει το μέγεθος της βλάβης που μπορεί να προκληθεί από ισχαιμική, τοξική, τραυματική ή φλεγμονώδη εγκεφαλική κάκωση. Είναι αποτελεσματική όχι μόνο όταν χορηγείται ενδοεγκεφαλικά ή ενδοκοιλιακά αλλά και περιφερικά (φλεβική αιματική κυκλοφορία), όσο επίσης και όταν η χορήγηση είναι καθυστερημένη μέχρι 1 ώρα σε περιπτώσεις ισχαιμίας και τουλάχιστον κατά 4 ώρες σε εγκεφαλικές κακώσεις(347).

Σε μια πρόσφατη μελέτη(348), η υπερ-έκφραση της sIL-1ra από αστροκύτταρα σε πειραματόζωα που υπέστησαν ΚΕΚ μειώνει το μέγεθος της βλάβης στο 50% και σχετίζεται με καθυστερημένη επαγωγή των φλεγμονωδών κυταροκινών και βελτιωμένη κλινική εικόνα. Είναι φανερό ότι τα ευρήματα αυτά έχουν και θεραπευτικές προεκτάσεις και στον τομέα αυτό κατευθύνεται μεγάλος όγκος έρευνας. Έτσι γονιδιακή θεραπεία με IL-1ra σε πειραματικά μοντέλα νόσων του κεντρικού νευρικού συστήματος(349) έδειξε σημαντικό περιορισμό της εγκεφαλικής βλάβης.

Δράση της IL-1 ανάλογα με την εντόπιση στον εγκέφαλο

Έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση IL-1 στις εγκεφαλικές κοιλίες ή το ραβδωτό σώμα πειραματικών μοντέλων που υπέστησαν σύγκλιση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας επιδεινώνει την εγκεφαλική βλάβη τόσο στο ραβδωτό σώμα όσο και στο φλοιό. Ωστόσο, αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρείται κατά τη χορήγηση IL-1 (ακόμα και σε πολύ υψηλότερες δόσεις) στον εγκεφαλικό φλοιό.

Όμοια, η IL-1ra είναι προστατευτική(350) όταν χορηγείται στο ραβδωτό σώμα και όχι στο φλοιό αρουραίων που υπόκεινται σε εγκεφαλική ισχαιμία, εγκεφαλική κάκωση ή χορήγηση τοξικών ουσιών. Χορήγηση IL-1 σε συνδυασμό με S-AMPA εντός του ραβδωτού σώματος καταλήγει σε εκτεταμένη βλάβη του εγκεφαλικού φλοιού. Παρόλα αυτά, κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται όταν η IL-1 χορηγείται εντός του εγκεφαλικού φλοιού.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η IL-1 και η IL-1ra ενεργοποιούν υποδοχείς και μεσολαβητές που βρίσκονται στο ραβδωτό σώμα και όχι στο φλοιό. Αυτοί μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση των νευρώνων τόσο τοπικά (στο ραβδωτό σώμα) όσο και σε απομακρυσμένες περιοχές (π.χ. στον εγκεφαλικό φλοιό). Το γεγονός αυτό πιθανόν να πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης ειδικών νευρωνικών κυκλωμάτων. Η φύση αυτών των υποδοχέων, μεσολαβητών και κυκλωμάτων παραμένει ακόμη άγνωστη.

Μηχανισμοί δράσης IL-1

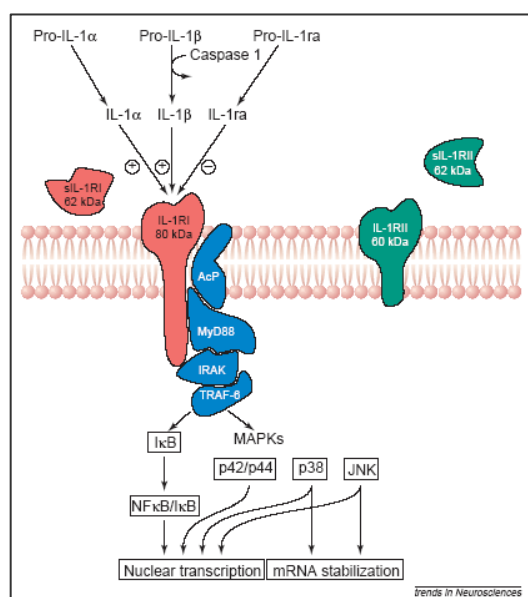
Παρόλο που η IL-1β εμπλέκεται στην δευτεροπαθή βλάβη του εγκεφαλικού παρεγχύματος, ο μηχανισμός δράσης της δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Αυτό οφείλεται κυρίως στις πολλαπλές δράσεις της IL-1β στη φλεγμονώδη αντίδραση και στις αλληλεπιδράσεις της με άλλα φλεγμονώδη μόρια.

Μονοπάτι μεταγωγής σήματος της IL-1 (signal transduction of IL-1)

Η πρόσδεση της IL-1 στον υποδοχέα τύπου I (IL-1RI) επάγει την αλληλεπίδραση τόσο της AcP πρωτεΐνης (accessory protein) όσο και της MyD88 πρωτεΐνης (adaptor protein) με την ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της IRAK κινάσης (IL-1R-associated kinase), η οποία συνδέεται με το σύμπλοκο AcP/MyD88(351). Στη συνέχεια, ενεργοποιούνται άλλες πρωτεΐνες όπως ο TNF (tumour necrosis factor), ο TRAF6 (receptor associated factor 6) και ο NFκB (nuclear factor kappa B). Ο NF-κB συνήθως παραμένει ανενεργός με τον σχηματισμό ενός συμπλέγματος με τον αναστολέα του IκB (NF-κB/IκB). Ωστόσο, η φωσφορυλίωση του IκB από IκB κινάσες (IKKα και IKKβ) καταλήγει στην απελευθέρωση του NF-κB που εισέρχεται στον πυρήνα. Μέσα στον πυρήνα, ο NF-κB προσδένεται στους προαγωγείς διάφορων γονιδίων-στόχων και επάγει την έκφραση τους(352).

Επίσης, η IL-1 ενεργοποιεί το μονοπάτι των πρωτεϊνικών κινασών. Στο μονοπάτι αυτό συμμετέχουν τρεις πρωτεϊνικές κινάσες(353): η p42/p44 MAPK (mitogen-activated protein kinase), η p38 MAPK και η JNK1 (c-Jun N-terminal kinase 1). Υποστηρίζεται ότι οι πρωτεϊνικές αυτές κινάσες ρυθμίζονται από μια G-πρωτεΐνη χαμηλού MB που βρίσκεται upstream αυτού του μονοπατιού(354). Ωστόσο, ο μηχανισμός που συνδέει το συστατικό αυτό με τις MAP κινάσες δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Δράση της Ιντερλευκίνης 1. Τα μέλη της οικογένειας της IL-1 περιλαμβάνουν τους αγωνιστές (IL-1 a,b) τον ανταγωνιστή (IL-1ra) και τους δύο υποδοχείς (τύπου I και II). Συντομεύσεις: AcP: accessory protein, MAP: mitogen-activated protein, IRAK: interleukin-1 receptor associated kinase, TRAF: tumour necrosis factor receptor associated factor, NF-κB: nuclear factor- κB, JNK: c-jun amino terminal kinase.



Έχει βρεθεί ότι εκλεκτική αναστολή των παραπάνω μονοπατιών μειώνει σημαντικά την έκταση της ισχαιμικής βλάβης στα πειραματόζωα(355, 356).

Δράσεις της IL-1 στους νευρώνες

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα συμπεράσματα εξάγονται κυρίως από in vitro μελέτες και μπορεί να έρχονται σε αντίθεση με τις in vivo παρατηρήσεις. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα νευρικά κύτταρα στις καλλιέργειες αντιπροσωπεύουν συνήθως ανώριμα κύτταρα χωρίς να υπάρχει αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα μέσω συναπτικών συνδέσεων ή με τη γλοία.

Πολλές από τις δράσεις της IL-1 στους νευρώνες μπορούν υπό ορισμένες συνθήκες να μειώσουν τον νευρωνικό θάνατο όπως για παράδειγμα η αναστολή εισόδου των ιόντων Ca^{2+} στα νευρικά κύτταρα(357), η αναστολή της απελευθέρωσης του γλουταμικού(358), η αναστολή της μακροπρόθεσμης ενίσχυσης (long-term potentiation)(359) και η αύξηση του GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ)(360). Παρ' όλα αυτά η IL-1 in vivo αυξάνει το θάνατο των νευρικών κυττάρων μέσω της επαγωγής της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX2) και της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (inducible nitric oxide synthase) (iNOS)(361). Επίσης η IL-1 επάγει ισχυρά την απελευθέρωση του υποθαλαμικού νευροπεπτιδίου CRF (corticotrophin releasing factor) το οποίο εμπλέκεται στην βλάβη του εγκεφάλου με άγνωστους μηχανισμούς(362).

Δράσεις της IL-1 στα κύτταρα της γλοίας

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η προκαλεί την απελευθέρωση νευροτοξινών από τα κύτταρα της γλοίας ιδίως τη μικρογλοία(363). Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς η φύση αυτών των ουσιών αλλά υπάρχουν αναφορές για το ρόλο του νιτρικού οξειδίου(364), των πρωτεϊνών οξειδίας φάσης (όπως η πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς και η α1-αντιχυμοθρυψίνη)(365) και του συμπληρώματος(366).

Επίδραση της IL-1 σε άλλους υποπληθυσμούς της γλοίας όπως τα αστροκύτταρα συνεπάγεται την έκκριση νευροτροφικών παραγόντων(367).

IL-1 και απόπτωση των νευρικών κυττάρων

Διάφορα γονίδια και μετατρεπτικά ένζυμα των ιντερλευκινών (caspase) εμπλέκονται στους αποπτωτικούς μηχανισμούς του ΚΝΣ. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η IL-1 συμμετέχει στην απόπτωση των νευρικών κυττάρων. Πειραματόζωα τα οποία στερούνται την caspase 1(368) (ένζυμο το οποίο ενεργοποιεί την IL-1β) ή η χορήγηση αναστολέων της(369) φαίνεται ότι μειώνει την έκταση της ισχαιμικής βλάβης.

IL-1 και βλάβη του αγγειακού τοιχώματος

Η IL-1 θεωρείται μια από τις πιο ισχυρές κυτταροκίνες που δρουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στις λείες μυϊκές ίνες. Η IL-1 προκαλεί ποικίλες φλεγμονώδεις αντιδράσεις στο αγγειακό τοίχωμα όπως επαγωγή μορίων

προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων(370) και αυξημένη έκφραση χημοκινών(339), παραγόντων πήξης και αναστολέων ινιδόλυσης(371). Επίσης, έχει βρεθεί ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών(372) και την έκκριση διαφόρων άλλων κυτταροκινών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τις λείες μυϊκές ίνες(370). Λόγω αυτών των δράσεων η IL-1 έχει εμπλακεί στην παθοφυσιολογία διαφόρων καρδιαγγειακών νοσημάτων(373).

Αντιθέτως, η IL-1ra που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τις λείες μυϊκές ίνες, αναστέλλει τις φλεγμονώδεις επιδράσεις της IL-1 στα κύτταρα των αγγείων και γι' αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του αγγειακού τοιχώματος(374). Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η ανασυνδυσασμένη IL-1ra αναστέλλει αποτελεσματικά τη δημιουργία αθηρωματικών αλλοιώσεων σε apoE^{-/-} ποντίκια(375). Επιπλέον μια σειρά μελετών σε knockout ή transgenic ποντίκια παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της IL-1 και της IL-1ra στην παθογένεια του αγγειακού τοιχώματος(376-380). Έτσι για παράδειγμα τα IL-1ra^{+/-} apoE^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν σημαντικότερο αριθμό αγγειακών βλαβών σε σύγκριση με τα μη μεταλλαγμένα στελέχη(378).

Τέλος σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη περιγράφηκε αυτόματη αρτηριακή φλεγμονή (381) σε knockout ποντίκια για το γονίδιο της IL-1ra. Στο αρτηριακό τοίχωμα υπήρχαν ενδείξεις χρόνιας φλεγμονής, διήθησης λευκοκυττάρων, καταστροφής ελαστικών στοιβάδων ή ενδείξεις επιδιορθωμένων βλαβών με ινώδη ουλοποίηση και απουσία λευκοκυτταρικής διήθησης. Αυτές οι αλλαγές οδηγούσαν σε στένωση ή διαστολή του αρτηριακού τοιχώματος και σε σχηματισμό ανευρυσμάτων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη σταθερότητα του τοιχώματος. Οι βλάβες συνήθως εντοπιζόνταν σε διακλαδώσεις ή καμπές των αγγείων, οι οποίες στους ανθρώπους αποτελούν περιοχές υψηλής στροβιλώδους ροής του αίματος και σχηματισμού αθηροσκληρωτικών πλακών. Τα ομοζυγωτικά ποντίκια πέθαιναν πρώιμα από αιμορραγία ως αποτέλεσμα ανευρυσματικής ρήξης που οφείλονταν σε χρόνιες εκφυλιστικές αλλοιώσεις του αρτηριακού τοιχώματος. Αντίθετα, τα ετεροζυγωτικά ποντίκια ανέπτυσσαν μικρές, μη-θανατηφόρες κακώσεις. Αυτή η αυτόματη αρτηριακή βλάβη στα ποντίκια που στερούνταν την IL-1ra αποδόθηκε στα επιβλαβή αποτελέσματα της τοπικής δράσης της IL-1, η οποία επάγεται από τη μηχανική βλάβη στο ενδοθήλιο.

IL-1 και θρόμβωση

Η συμμετοχή των κυτταροκινών στις διαδικασίες πήξης αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Η IL-1 βρέθηκε ότι έχει θρομβωτικές ιδιότητες και εμπλέκεται σε δύο μονοπάτια: ένα θρομβωτικό και ένα

αντιθρομβωτικό(382). Η IL-1(383) επάγει την παραγωγή και έκφραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μονοκύτταρα του ιστικού παράγοντα με αποτέλεσμα την ταχεία έναρξη του πηκτικού μηχανισμού ενδαγγειακά. Ταυτόχρονα η IL-1 αναστέλλει το αντιθρομβωτικό μονοπάτι της πρωτεΐνης C(382). Το μονοπάτι της πρωτεΐνης C ενεργοποιείται όταν η θρομβίνη συνδεθεί με μια πρωτεΐνη του ενδοθηλίου την thrombomodulin. Η IL-1 καταστέλλει την παραγωγή αυτής της πρωτεΐνης όπως επίσης και του υποδοχέα της πρωτεΐνης C. Τέλος να σημειωθεί ότι η IL-1 συμμετέχει στη συγκόλληση και συσώρευση των αιμοπεταλίων(384). Μελέτες έδειξαν ότι οι θρομβωτικές ιδιότητες της IL-1 αναστέλλονται με τη χορήγηση αντιφλεγμονωδών ιντερλευκινών(385).

IL-1 και πυρετός:

Η IL-1β είναι μια ισχυρή πυρετογόνος ουσία(386). Είναι γνωστό επίσης ότι η υπερθερμία επιδεινώνει την εγκεφαλική βλάβη. Το ερώτημα που τίθεται είναι εάν η επιδείνωση της εγκεφαλικής βλάβης που προκαλείται από τη χορήγηση της IL-1β είναι ανεξάρτητη ή όχι της αύξησης της θερμοκρασίας. Έχει αναφερθεί ότι η ενδοεγκεφαλική ή ενδοκοιλιακή χορήγηση IL-1β σε πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν σύγκλιση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας επιδεινώνει τη βλάβη του εγκεφάλου και προκαλεί μια σημαντική αύξηση στη θερμοκρασία του σώματος. Αντίθετα, η χορήγηση IL-1β εντός του ραβδωτού σώματος καταλήγει σε βλάβη του ραβδωτού σώματος και του φλοιού, χωρίς να προκαλεί αλλαγές στη θερμοκρασία του σώματος. Αυτό φανερώνει ότι η επιδείνωση της εγκεφαλικής βλάβης που επάγεται από την IL-1β είναι ανεξάρτητη από την αλλαγή στη θερμοκρασία του σώματος.

IL-1 και νευροπροστατευτικές δράσεις:

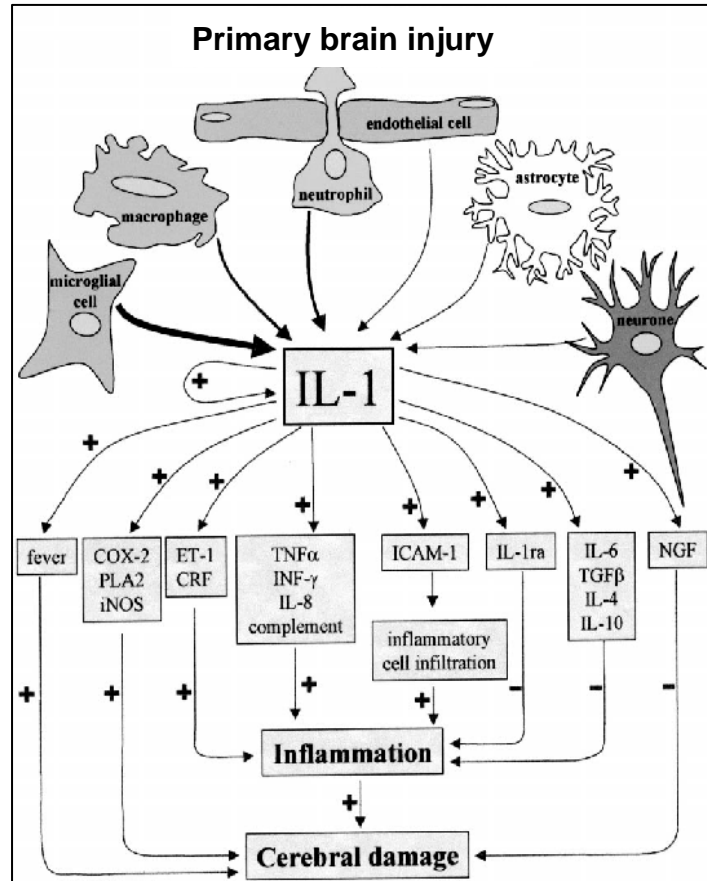
Έχει παρατηρηθεί ότι η IL-1 δεν είναι νευροτοξική in vivo σε απουσία πρωτοπαθούς βλάβης, ενώ σε in vitro πειράματα η IL-1 δεν προκαλεί απόπτωση των νευρικών κυττάρων εκτός αν χορηγηθεί σε υψηλές δόσεις. Επίσης, μετά από χορήγηση τοξικών ουσιών σε καλλιέργεια νευρώνων η IL-1 προστατεύει τους νευρώνες πιθανόν μέσω επαγωγής του NGF (nerve growth factor)(367). Επομένως, η IL-1 πιθανόν να επιδρά στη νευρωνική επιβίωση(387) ή θάνατο(388) μέσω περίπλοκων μηχανισμών και της συμμετοχής διάφορων τύπων νευρικών κυττάρων(389). Με άλλα λόγια, οι ωφέλιμες ή οι επιβλαβείς επιδράσεις της IL-1β φαίνεται να εξαρτώνται από το χρόνο, τη διάρκεια, τα επίπεδα και την περιοχή που εκφράζεται η IL-1β στον εγκέφαλο μετά από βλάβη.

Άλλες δράσεις της IL-1

Η IL-1 προκαλεί διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με αποτέλεσμα τη δημιουργία αγγειογενούς οιδήματος. Επίσης επάγει την σύνθεση μορίων

προσκόλλησης (π.χ intracellular cell-adhesion molecule 1, ICAM-1) που έχει ως συνέπεια τη συσσώρευση των λευκοκυττάρων. Η IL-1 επιδρά στη νευροδιαβίβαση και μεσολαβεί στην απελευθέρωση άλλων φλεγμονωδών μεταβολιτών ή ενζύμων όπως προσταγλανδίνες, κολλαγενάση και φωσφολιπάση A2(390).

Απεικόνιση των πιθανών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην IL-1 και άλλες φλεγμονώδεις ουσίες, αυξητικούς παράγοντες και μόρια προσκόλλησης. COX-2: κυκλοοξυγενάση 2, PLA2: φωσφολιπάση A2, iNOS: inducible NO synthase, ET-1: endothelin 1, CRF: corticotropin releasing factor, TNF α : tumor necrosis factor α , INF γ : ιντερφερόνη γ , ICAM-1: intercellular cell adhesion molecule 1, IL-1ra: interleukin-1 receptor antagonist, IL-6: ιντερλευκίνη 6, TGF β : transforming growth factor b, IL-4: ιντερλευκίνη 4, IL-10: ιντερλευκίνη 10, NGF: nervous growth factor.



Ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (IL-1Ra)

Η IL-1Ra παρουσιάζει 18% ομολογία αμινοξέων με την IL-1 α και 26% ομολογία με την IL-1 β . Η οικογένεια της IL-1Ra περιλαμβάνει μια εξωκυττάρια ισομορφή (sIL-1Ra) και τρεις ενδοκυττάρια ισομορφές (icIL-1Ra1,2,3)(391).

Συγκεκριμένα, η sIL-1Ra πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 17KDa, αποτελείται από 177 αμινοξέα και περιέχει μια αλληλουχία οδηγού ("leader sequence"), η οποία απομακρύνεται όταν ολοκληρωθεί η λειτουργία της. Το ανθρώπινο γονίδιο για την sIL-1Ra πρωτεΐνη περιέχει 4 εξόνια και 3 ιντρόνια.

Από την άλλη πλευρά, η icIL-1Ra πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 18KDa (icIL-1Ra1) και αποτελείται από 159 αμινοξέα. Αυτές οι δύο ισομορφές της IL-1Ra δημιουργούνται από εναλλακτικό μάτισμα ('splicing'), όπου συμμετέχουν διαφορετικά πρώτα εξόνια. Το πρώτο εξόνιο για την icIL-1Ra βρίσκεται 9.4Kb upstream από το πρώτο εξόνιο για την sIL-1Ra. Η εσωτερική αλληλουχία δέκτη ματίσματος για την

icIL-1Ra βρίσκεται εντός του πρώτου εξονίου για την sIL-1Ra, κοντά στο 3' άκρο της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για το πεπτιδίο συνθήματος ("signal peptide"). Έτσι, η icIL-1Ra δεν έχει μια λειτουργική αλληλουχία οδηγού. Για το λόγο αυτό, η icIL-1Ra πρωτεΐνη παραμένει στο κυτταρόπλασμα.

Η icIL-1Ra εντοπίζεται σε μεγάλα ποσοστά στο δέρμα, και κυρίως σε κερατινοκύτταρα και άλλα επιθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, αποτελεί και προϊόν των ενεργοποιημένων μονοκύτταρων και μακροφάγων.

Η sIL-1Ra πρωτεΐνη παράγεται από οποιοδήποτε κύτταρο που συνθέτει IL-1, με εξαίρεση τα ενδοθηλιακά (τα οποία παράγουν αποκλειστικά icIL-1Ra πρωτεΐνη). Έτσι, εκκρίνεται από μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, περιφερικά ερυθροκύτταρα. Στα ποντίκια, η κατανομή της IL-1Ra στους ιστούς φανερώνει ότι η sIL-1Ra βρίσκεται κυρίως στους πνεύμονες και το σπλήνα. Τέλος, οι ινοβλάστες παράγουν mRNA και πρωτεΐνη και των δύο ισομορφών της IL-1Ra, όταν διεγείρονται κατάλληλα(392).

Δύο επιπρόσθετες ενδοκυττάρια μορφές της IL-1Ra έχουν επίσης περιγραφεί(393). Μια ενδοκυττάρια μορφή με μοριακό βάρος 25KDa καλείται icIL-1Ra2. Το mRNA της icIL-1Ra2 περιέχει μια αλληλουχία 63bp εντός πλαισίου ανάγνωσης που βρίσκεται μέσα στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου της icIL-1Ra. Αυτή η ενδοκυττάρια ισομορφή περιέχει τα ίδια 3 NH₂-τελικά κατάλοιπα με την αρχική μορφή της icIL-1Ra, τα οποία συνδέονται με μια μοναδική ένθεση 21 αμινοξέων. Το mRNA της icIL-1Ra2 έχει βρεθεί σε ενεργοποιημένους ινοβλάστες, σε μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και κερατινοκύτταρα. Ωστόσο, η πρωτεΐνη της icIL-1Ra2 δεν έχει βρεθεί σε ανθρώπινα κύτταρα, οπότε αυτό το mRNA πιθανόν να μην μεταφράζεται *in vivo*.

Μια μικρότερη ισομορφή με μοριακό βάρος 16KDa καλείται icIL-1Ra3(394). Αυτό το μόριο έχει βρεθεί σε μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ηπατικά κύτταρα. Πιθανόν να δημιουργείται από εναλλακτικό μάτισμα ή εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης. Τέλος, αυτή η ισομορφή προσδένεται λιγότερο αποτελεσματικά στους υποδοχείς της IL-1 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ισομορφές της IL-1Ra.

Η ρύθμιση των αποτελεσμάτων της IL-1 στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον θα μπορούσε να αποτελεί μείζονα βιολογικό ρόλο για την εξωκυττάρια sIL-1Ra. Παρόλα αυτά το γεγονός ότι τουλάχιστον δύο ισομορφές της ενδοκυττάριας IL-1Ra διατηρούνται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης φανερώνει ότι πιθανόν να συμμετέχουν σε επιπρόσθετες άγνωστες ως τώρα λειτουργίες εντός των κυττάρων(395).

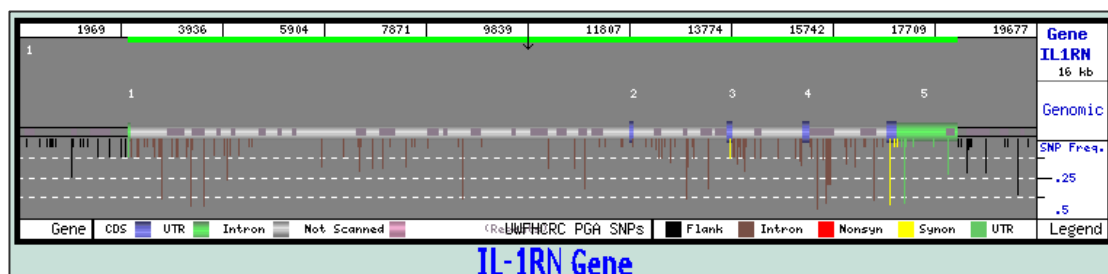
Η παραγωγή της IL-1Ra επάγεται από έναν αριθμό άλλων κυτοκινών, προϊόντα ιών και βακτηρίων, και πρωτεΐνες οξείας φάσης(396), φανερώνοντας ότι αυτή η κυτοκίνη πιθανόν να παράγεται *in vivo* σε πολυάριθμες χρόνιες φλεγμονώδεις και μολυσματικές ασθένειες(397).

Η IL-1Ra προσδένεται στους υποδοχείς με ένταση αλληλεπίδρασης σχεδόν ισοδύναμη με τους δύο αγωνιστές, αλλά αποτυγχάνει να ενεργοποιήσει τα κύτταρα. Και οι δύο τύποι υποδοχέων είναι μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig) και διαθέτουν 3 περιοχές ανοσοσφαιρίνης στα εξωκυττάρια τμήματά τους. Η IL-1β προσδένεται με μεγαλύτερη δύναμη σύνδεσης στον διαλυτό υποδοχέα τύπου II από την IL-1Ra. Αυτός ο τύπου II υποδοχέας λειτουργεί ως αναστολέας των δράσεων της IL-1 in vivo γιατί δεν επάγει ενδοκυττάριο σήμα. Σε αντίθεση, ο διαλυτός υποδοχέας τύπου I προσδένει IL-1Ra σχεδόν εκλεκτικά λόγω μεγαλύτερης δύναμης σύνδεσης σε σχέση με την IL-1.

Μελέτες φανερώνουν ότι η IL-1β και η IL-1Ra έχουν δομή β-πτυχωτού φύλλου(397) , ενώ τα κατάλοιπα της κοινής επιφάνειας των δύο μορίων προσδένονται στην ίδια περιοχή του υποδοχέα τύπου I. Ωστόσο, η φορτισμένη περιοχή της IL-1Ra δεν αλληλεπιδρά με την τρίτη περιοχή του διαλυτού υποδοχέα τύπου I. Για παράδειγμα, ένας υποδοχέας που περιέχει τις περιοχές 1 και 2 προσδένει την IL-1α και IL-1β με χαμηλή συγγένεια, αλλά προσδένει την IL-1Ra με υψηλή συγγένεια. Έτσι, η περιοχή 3 είναι απαραίτητη για να επιτυγχάνεται υψηλής συγγένειας πρόσδεση με τους δύο αγωνιστές(398).

Το γονίδιο της IL-1Ra

Το ανθρώπινο γονίδιο της IL-1Ra (IL1RN) έχει χαρτογραφηθεί στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 2, στην περιοχή q14-q21(399). Τα γονίδια για την IL-1α (IL-1A), IL-1β (IL-1B) και IL-1Ra χαρτογραφούνται σ' ένα περιοριστικό τμήμα 430Kb: το IL-1A βρίσκεται ανάμεσα στο +0 και +35Kb, το IL-1B ανάμεσα στο +70 και +110Kb και το IL1RN ανάμεσα στο +330 και το +430Kb. Είναι ενδιαφέρον ότι τα γονίδια για τους ανθρώπινους υποδοχείς τύπου I και II επίσης βρίσκονται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 2, αλλά όχι κοντά στα γονίδια που κωδικοποιούν για τους τρεις συνδέτες.



Το γονίδιο της IL-1Ra

Λειτουργικός πολυμορφισμός στο ανθρώπινο γονίδιο της IL-1Ra

Ένας πολυμορφισμός παρατηρείται στο ιντρόνιο 2 του ανθρώπινου γονιδίου της IL-1Ra και οφείλεται στην παρουσία μιας 86bp εν σειρά επανάληψης ποικίλου αριθμού (2-6 επαναλήψεις)(400). 5 αλληλόμορφα έχουν περιγραφεί και η αλληλομορφική αυτή περιοχή περιέχει τρεις περιοχές σύνδεσης πρωτεϊνών, οι οποίες φαίνεται να ευθύνονται για τη λειτουργικότητα του πολυμορφισμού. Τα αλληλόμορφα 1, 2, 3, 4, 5 παρουσιάζουν αντίστοιχα 4, 2, 3, 5, 6 επαναλήψεις της 86bp αλληλουχίας.

Σε ένα φυσιολογικό Δυτικό πληθυσμό η συχνότητα του αλληλομόρφου 1 είναι περίπου 73% στις ενώ η συχνότητα του αλληλομόρφου 2 κυμαίνεται στο 21%. Η κατανομή των αλληλομόρφων διαφέρει σημαντικά στις διάφορες φυλές.

Πιθανός μηχανισμός του πολυμορφισμού της IL-1ra

Ο μηχανισμός συσχέτισης του IL1RN*2 με φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες, καθώς και η λειτουργική επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στην παραγωγή IL-1ra και IL-1β δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Μελέτες έχουν δείξει ότι το IL1RN*2 έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή IL-1β από τα μονοκύτταρα ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς της IL-1β(303). Από την άλλη πλευρά, τα μονοκύτταρα των φορέων του αλληλομόρφου 2 έχουν μια αυξημένη ικανότητα να παράγουν IL-1Ra πρωτεΐνη in vitro(401). Επίσης, αυτά τα άτομα έχουν υψηλότερα επίπεδα sIL-1ra σε σχέση με τους μη-φορείς. Αντιθέτως, το IL1RN*2 σχετίζεται με μειωμένη παραγωγή icIL-1ra1 από τα επιθηλιακά(397) και τα ενδοθηλιακά κύτταρα(402): γεγονός που εξηγεί τον συσχετισμό του αλληλομόρφου 2 με μια μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων ασθενειών κυρίως επιθηλιακής ή ενδοθηλιακής προέλευσης(397). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η icIL-1ra1 ελευθερώνεται από τα κύτταρα κάτω από ορισμένες συνθήκες και εμποδίζει την πρόσδεση της IL-1 στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Συνεπώς, οι φορείς του αλληλομόρφου 2 αντιπροσωπεύουν έναν προ-φλεγμονώδη φαινότυπο καθώς συνδυάζουν την αυξημένη ενεργοποίηση IL-1α και IL-1β με την μειωμένη παραγωγή icIL-1ra1. Αυτός ο προ-φλεγμονώδης φαινότυπος πιθανόν να επηρεάζει την ακεραιότητα και τη σύσταση του αγγειακού τοιχώματος. Έτσι, αυτό γίνεται επιρρεπές και εύθραυστο σε μηχανικές κακώσεις. Επιπλέον είναι πολύ πιθανό να επηρεάζει την ένταση και τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης του εγκεφαλικού παρεγχύματος που επάγεται από μια πρωτοπαθή βλάβη. Αυτό έχει ως συνέπεια την αυξημένη βλάβη του νευρικού ιστού και απόπτωσης των νευρικών κυττάρων.

Συσχέτιση του πολυμορφισμού της IL-1ra με άλλες νόσους

Το IL1RN*2 έχει συσχετιστεί με μια ποικιλία ανθρωπίνων ασθενειών κυρίως φλεγμονώδους και αυτοάνοσης αρχής(397). Σε πολλές από αυτές, το IL1RN*2 σχετίζεται με τη σοβαρότητα και όχι με την ευαισθησία και την προδιάθεση να αποκτήσει κάποιος την νόσο.

IL-1ra VNTR πολυμορφισμός	
✓	Δερματικές εκδηλώσεις σε συστηματικό ερυθηματώδη λύκο
✓	Σοβαρές μορφές του συνδρόμου Sjögren
✓	Νεανικές ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις μυοπάθειες
✓	Νεανική χρόνια αρθρίτιδα
✓	Βαριά ρευματοειδής αρθρίτιδα
✓	Σκληρυντικός λειχήνας
✓	Σοβαρότητα της κατά πλάκας αλωπεκίας
✓	Πρώιμης εμφάνισης ψωρίασης
✓	Ελκώδης κολίτιδα
✓	Η σοβαρότητα της σκλήρυνσης κατά πλάκας
✓	Henoch–Schönlein νεφρίτιδα και IgA νεφροπάθεια
✓	Καρκίνος στομάχου
✓	Διαβητική νεφροπάθεια
✓	Σοβαρή σήψη
✓	Πρώιμης εμφάνισης περιοδοντίτιδα
✓	Βρογχικό άσθμα
✓	Ινώδης κυψελίτιδα
✓	Πνευμοκονίωση λόγω εισπνοής σκόνης σιλικόνης σε ανθρακωρύχους
✓	Σοβαρότητα της απόρριψης μοσχεύματος (Graft-versus-host-disease) σε δέκτες μυελού των οστών με διαφορετική αντιγονική σύσταση
✓	Ιδιοπαθής υποτροπιάζουσα αποβολή εμβρύου
✓	Grave's disease
Μερικές από τις νόσους με τις οποίες το IL1RN*2 αλληλόμορφο έχει συσχετιστεί	

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μελέτες συσχέτισης

Οι τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, και κυρίως η μελέτη των γενετικών πολυμορφισμών έχουν εισαχθεί σε όλες τις πτυχές της κλινικής έρευνας. Οι μελέτες αυτές στηρίζονται στο γεγονός ότι οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των ανθρώπων, όπως οι ανθρωπομετρικές διαφορές, η ευαισθησία στην εκδήλωση της εξεταζόμενης νόσου και η απόκριση του οργανισμού σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες οφείλονται σε τυχαίες αλλαγές της αλληλουχίας του γενώματος. Οι πιο συχνοί πολυμορφισμοί είναι οι εκείνοι που προκαλούν την αλλαγή ενός απλού νουκλεοτιδίου (SNPs: single nucleotide polymorphisms). Οι SNPs πολυμορφισμοί συναντώνται κατά μήκος ολόκληρου του γενώματος και είναι πιθανόν να συμβαίνουν και κοντά στις κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων.

Οι μελέτες συσχέτισης εξετάζουν τη συχνότητα με την οποία τα αλληλόμορφα που προκύπτουν από τους SNPs πολυμορφισμούς συναντώνται στους φορείς του υπό εξέταση νοσήματος σε σύγκριση με τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου. Σε περίπτωση που η τιμή της συσχέτισης θεωρείται στατιστικά σημαντική, τότε ο μελετούμενος πολυμορφισμός συνδέεται άμεσα με μια γονιδιακή περιοχή υπεύθυνη για την εκδήλωση της εξεταζόμενης νόσου ή βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με έναν άλλο λειτουργικό πολυμορφισμό. Η συμφωνία στα αποτελέσματα μεταξύ των διάφορων μελετών που πραγματοποιούνται σε ανεξάρτητους πληθυσμούς φανερώνει ότι ο μελετούμενος πολυμορφισμός αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της εξεταζόμενης νόσου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης

Στην παθογένεση της πρωτοπαθούς ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας (ΠΕΑ) εμπλέκονται τόσο γενετικοί όσο και επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου. Η Α1-αντιχυμοθρυψίνη (ACT), το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης (ACE) και οι ιντερλευκίνες (IL) 1α, 1β και 1Ra έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην παθολογία του αγγειακού τοιχώματος και τους μηχανισμούς πήξης. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο TT γονότυπος του A/T πολυμορφισμού του πεπτιδίου συνθήματος της ACT και ο DD γονότυπος του I/D πολυμορφισμού της ACE αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΠΕΑ. Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο VNTR πολυμορφισμός της IL-1Ra σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για αιμορραγικά φαινόμενα σε ασθενείς με κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Σκοπός της παρούσας προοπτικής μελέτης είναι η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης

μεταξύ των ACT A/T, ACE I/D, IL-1α (-899), IL-1β (-511) και IL-1Ra (VNTR) γενετικών πολυμορφισμών και Ελλήνων ασθενών με ΠΕΑ.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος από Μάρτιο του 2003 έως Μάιο του 2006, 178 ασθενείς οι οποίοι προσήλθαν στο τμήμα επειγόντων περιστατικών του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας με ΠΕΑ συλλέχθηκαν προοπτικά.

Η καταγραφή των ασθενών αυτών περιλάμβανε:

1. Πλήρη καταγραφή των επιδημιολογικών στοιχείων των ασθενών όπως ηλικία, ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης, καρδιαγγειακής νόσου, σακχαρώδους διαβήτη, υπερλιπιδαιμίας, καπνίσματος, κατανάλωσης αλκοόλ, οικογενειακού ιστορικού αιμορραγικού ΑΕΕ. Υπερτασικοί θεωρήθηκαν οι ασθενείς όταν η συστολική πίεση ήταν >140mm Hg ή η διαστολική πίεση ήταν >90mm Hg σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ή ελάμβαναν αντιυπερτασική αγωγή. Η διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη τέθηκε στους ασθενείς που ήδη ελάμβαναν ινσουλίνη ή υπογλυκαιμική αγωγή ή όταν η γλυκόζη νήστεως ήταν >126mg/dl σε διαδοχικές μετρήσεις ή η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη ήταν >6.4%. Υπερχοληστερολαιμία ορίστηκε ως η τιμή της χοληστερόλης του πλάσματος >200mg/dl ή η λήψη υπολιπιδαιμικής αγωγής. Όσον αφορά το κάπνισμα δημιουργήθηκαν δύο υποκατηγορίες ασθενών: τωρινοί καπνιστές και παλιότεροι καπνιστές.
2. Καταγραφή της νευρολογικής σημειολογίας και της βαρύτητας της νόσου με βάση την κλίμακα κώματος Γλασκώβης (GCS)(403). Η GCS όπως φαίνεται στον επόμενο πίνακα λαμβάνει τιμές από 3 στο βαθύ κώμα έως 15 όταν δεν υπάρχει διαταραχή του επιπέδου συνείδησης. Για καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν τρεις υποκατηγορίες ασθενών ανάλογα με τις τιμές της GCS: 3-8, 9-12 και 13-15 αντιπροσωπεύοντας αντίστοιχα την βαριά, μέτρια και ελαφριά κλινική εικόνα(68).

Κλίμακα Γλασκώβης		
Άνοιγμα ματιών	Αυθόρμητα	4
	Σε πρόσταγμα	3
	Σε πόνο	2
	Καμιά αντίδραση	1
Η αντίδραση στο λόγο	Προσανατολισμένος	5
	Συγκεχυμένος	4
	Μόνο λέξεις, φωνές	3
	Ήχοι, βογκητά	2
	Καμιά αντίδραση	1
Η κινητική αντίδραση	Ακολουθεί παραγγελίες	6
	Εντοπίζει τον πόνο	5
	Κάμψη σε πόνο (απόσυρση κανονική)	4
	Κάμψη αποφλοίωσης σε πόνο	3
	Έκταση απεγκεφαλισμού σε πόνο	2
	Καμιά αντίδραση	1

3. Πλήρη αιματολογικό έλεγχο για αποκλεισμό αιματολογικών διαταραχών που μπορεί να προκαλέσουν εγκεφαλική αιμορραγία.
4. Απεικονιστικό έλεγχο, που περιλάμβανε αξονική τομογραφία ή μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου. Επίσης, διενέργεια μαγνητικής αγγειογραφίας ή ψηφιακής αγγειογραφίας όπου υπήρχαν ενδείξεις ύπαρξης αγγειακής δυσπλασίας ή ανευρύσματος. Με βάση τα ευρήματα του απεικονιστικού ελέγχου δημιουργήθηκαν δύο κατηγορίες σε σχέση με την εντόπιση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα που αντανακλούν και διαφορετικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς: λοβώδη αιμορραγία όταν αφορούσε το φλοιό του εγκεφάλου και την υποκείμενη λευκή ουσία και μη-λοβώδη όταν εντοπιζόταν στις εν τω βάθει δομές όπως τα βασικά γάγγλια, την παρεγκεφαλίδα και το στέλεχος του εγκεφάλου(155). Επίσης με βάση τον απεικονιστικό έλεγχο γινόταν υπολογισμός του όγκου της αιμορραγίας με τη χρήση του τύπου ABC/2, όπου A, B, και C οι διάμετροι της βλάβης(81, 404). Και σε αυτήν την περίπτωση δημιουργήθηκαν δύο ομάδες ασθενών: με μεγάλη αιμορραγία (>30ml) και σχετικά μικρή αιμορραγία (≤30ml)(68).
5. Αιμοληψία για απομόνωση DNA (μετά από έγγραφη συγκατάθεσή τους).

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν η παρουσία αγγειακών δυσπλασιών, ανευρυσμάτων η ύπαρξη διαταραχών πήξης (πχ λήψη Sintrom), όγκων εγκεφάλου, αιμορραγικής μετατροπής ισχαιμικού ΑΕΕ, αγγειίτιδας του ΚΝΣ ή η λήψη συμπαθητικομιμητικών φαρμάκων.

Οι ασθενείς επανεξετάστηκαν στα εξωτερικά ιατρεία της Νευρολογικής κλινικής 6 μήνες μετά το συμβάν και αξιολογήθηκε η λειτουργική αποκατάστασή τους με βάση την τροποποιημένη κλίμακα του Rankin (mRS) όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Για καλύτερη στατιστική ανάλυση δημιουργήθηκαν δύο κατηγορίες ασθενών: ευνοϊκής έκβασης (mRS=0-3) στην οποία ανήκαν οι ασθενείς που ήταν λειτουργικά ανεξάρτητοι μετά το συμβάν και η κατηγορία της μη ευνοϊκής έκβασης (mRS=4-6)(97, 405).

Modified Rankin scale (mRS)	
Καθόλου συμπτώματα	0
Χωρίς σημαντική ανικανότητα παρά τα συμπτώματα: ικανός να φέρει εις πέρας συνήθη καθήκοντα και δραστηριότητες	1
Ελαφρά ανικανότητα: μη ικανός να φέρει εις πέρας όλες τις προηγούμενες δραστηριότητες αλλά ικανός να φροντίσει τις δικές του υποθέσεις χωρίς βοήθεια.	2
Μέτρια ανικανότητα: χρειάζεται κάποια βοήθεια, αλλά ικανός να περπατά χωρίς βοήθεια	3
Μετρίως σοβαρή ανικανότητα: μη ικανός να περπατά χωρίς βοήθεια, και να προσέχει τις σωματικές του ανάγκες χωρίς βοήθεια.	4
Σοβαρή ανικανότητα: κατάκοιτος, με ακράτεια, και έχοντας ανάγκη συνεχούς νοσηλευτικής φροντίδας και παρακολούθησης	5
Θάνατος	6

Επίσης, κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης συλλέχθηκαν από τα εξωτερικά ιατρεία της Νευρολογικής κλινικής επιδημιολογικά στοιχεία και αίμα για DNA ανάλυση από 206 φυσιολογικούς μάρτυρες σε αντιστοιχία με τους ασθενείς ως προς την ηλικία και το φύλο.

Ανάλυση των πολυμορφισμών

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από περιφερικό αίμα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της εξαλάτωσης(406). Ακολούθησε έλεγχος της ποιότητας και της συγκέντρωσης του DNA. Η ταυτοποίηση των γονοτύπων των πολυμορφισμών έγινε Ανάλυση του πολυμορφισμού της ACT

Η ενζυμική ενίσχυση του DNA πραγματοποιήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και πιο ειδικά ενισχύθηκε η περιοχή που περιέχει τον πολυμορφισμό στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος του γονιδίου της ACT. Το προϊόν της PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (3%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο BstN I και τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης metarhor (3%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV.

Ανάλυση του πολυμορφισμού της IL-1ra

Ενισχύθηκε με PCR η περιοχή που περιέχει τον VNTR πολυμορφισμό στο δεύτερο ιντρόνιο του γονιδίου της IL-1ra. Το τμήμα που ενισχύθηκε(407) εκτείνεται από τη θέση 28681 μέχρι τη θέση 28970 (Gene Bank Accession Number U65590). Τα αλληλόμορφα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγιναν ορατά με υπεριώδη ακτινοβολία.

Ανάλυση του πολυμορφισμού της IL-1β(-511)

Ενισχύθηκε η περιοχή που περιέχει τον πολυμορφισμό στη θέση -511 του υποκινητή του γονιδίου της IL-1B. Το προϊόν της PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2.5%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο Ava I και τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης (2.5%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV.

Ανάλυση του πολυμορφισμού της IL-1α(-889)

Ενζυμική ενίσχυση του DNA πραγματοποιήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και πιο ειδικά ενισχύθηκε η περιοχή που περιέχει τον πολυμορφισμό στη θέση -889 του υποκινητή του γονιδίου της IL-1A. Το προϊόν της PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (4%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο Nco I και τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης (4%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV.

Ανάλυση του πολυμορφισμού του ACE

Ενισχύθηκε η περιοχή που περιέχει τον πολυμορφισμό στο ιντρόνιο 16 του γονιδίου του ACE(258). Τα αλληλόμορφα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη (2%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγιναν ορατά με υπεριώδη ακτινοβολία.

Στατιστική ανάλυση

Η ισορροπία Hardy-Weinberg (H-W) εξετάστηκε με τη χρήση του exact test στο ειδικό πρόγραμμα GENPOP. Οι πιθανές συσχετίσεις των διαφόρων αλληλόμορφων ή των γονοτύπων μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών μαρτύρων εξετάστηκαν με τη χρήση του t-test, του Fisher exact test ή το χ^2 . Παρόμοια ελέγχθηκαν οι διάφορες υποκατηγορίες των ασθενών με ΕΑ (υπερτασικοί-μη υπερτασικοί ασθενείς, λοβώδης μη-λοβώδης εντόπιση της αιμορραγίας, όγκος της αιμορραγίας (>30ml, <30ml), κλίμακα κώματος της Γλασκώβης κατά την είσοδο του ασθενούς (3-8, 9-12, 13-15), και έκβαση ανάλογα με την τροποποιημένη κλίμακα έκβασης του Rankin (ευνοϊκή, μη ευνοϊκή έκβαση) σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση με λογιστική παλινδρόμηση (logistic regression) με βάση την οποία υπολογίστηκε ο λόγος αναλογιών (odds ratio) με τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% confidence intervals) μετά από σταθεροποίηση για τους διάφορους παράγοντες κινδύνου που καταγράφηκαν (ηλικία, φύλο, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, σακχαρώδη διαβήτη, ισχαιμική καρδιοπάθεια, κάπνισμα και λήψη αλκοόλ). Κατά την διάρκεια της ανάλυσης για την έκβαση με βάση την κλίμακα mRS το μοντέλο ανάλυσης σταθεροποιήθηκε και για τη βαρύτητα της κάκωσης με βάση την GCS εισόδου.

Για τη μελέτη των πολυμορφισμών εξετάστηκε η επίδραση των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων εφαρμόζοντας επικρατητικό ή υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης. Επίσης εξετάστηκε αν η επίδραση των αλληλομόρφων έχει σχέση με τον αριθμό τους δηλαδή αν υπάρχει δοσοεξαρτώμενο αποτέλεσμα.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις εκτελέστηκαν χρησιμοποιώντας τα στατιστικά πακέτα SPSS v.11 (Chicago, IL) και SAS v.6.12 (Cary, NC). Τιμές p μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Απομόνωση DNA

Βασικό και πρωταρχικό βήμα για τη μελέτη του DNA αποτελεί, αναμφισβήτητα, η σωστή και αποτελεσματική απομόνωσή του από τα κύτταρα του οργανισμού. Ζητείται πάντα μια μέθοδος απομόνωσης DNA που να είναι αποδοτική ποσοτικά και να δίνει DNA σε καλή κατάσταση. Αυτό συμβαίνει όταν το DNA είναι ελεύθερο προσμίξεων και δεν είναι διασπασμένο σε πολύ μικρά κομμάτια που δεν μπορούν να ενισχυθούν και να αναλυθούν.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι απομόνωσης γενωμικού DNA. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως το είδος και η ποσότητα των διαθέσιμων κυττάρων, το είδος και η ποιότητα του DNA που θέλουμε να απομονώσουμε. Στο συγκεκριμένο πειραματικό στάδιο εφαρμόστηκε η μέθοδος της εξαλάτωσης. Η απομόνωση γενωμικού DNA γίνεται από εμπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος (πυρήνες λευκοκυττάρων). Για τη διαδικασία αυτή λαμβάνονται 10ml αίματος που τοποθετούνται σε σωληνάριο, παρουσία αντιπηκτικού Na_2EDTA . Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του γενωμικού DNA φαίνονται στο παρακάτω πίνακα:

<p>–Διάλυμα διάσπασης των πυρήνων Lysis I: NH_4Cl (155mM), KHCO_3 (10mM), EDTA (1mM), pH=7.4 Lysis II : Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na EDTA (2mM), pH=8.2 –Διάλυμα πρωτεϊνάσης K (10mg/ml) –Διάλυμα 10% w/v SDS (sodium dodecyl sulfate: δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο) –Κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M) –Απόλυτη αιθανόλη –CH_3COONa (3M) –Πηκτή αγαρόζης 1%</p>

Τα στάδια που ακολουθούνται για την απομόνωση του DNA με τη μέθοδο της εξαλάτωσης παρουσιάζονται παρακάτω:

1η μέρα

1. Τοποθετούμε το αίμα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15ml και αραιώνουμε ως 12ml με ddH₂O (δως απεσταγμένο νερό). Ακολουθεί καλή ανάδευση (με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων).
2. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 4°C (απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων).
3. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία συνεχίζεται με το ίζημα. Τα κύτταρα αραιώνονται σε ddH₂O έως 12ml και ανακινούμε σε vortex.
4. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 4°C.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα lysis I μέχρι τα 12ml.
6. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 4°C.
7. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 5 και 6 με lysis I.
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα lysis II μέχρι τα 6ml (τα λυτικά διαλύματα lysis I και lysis II διευκολύνουν τη διάσπαση των πυρηνικών μεμβρανών για την απελευθέρωση του DNA. Επίσης, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, περιέχουν EDTA που δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα (Ca²⁺, Mg²⁺) που θεωρούνται απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Έτσι, τα ένζυμα αυτά απενεργοποιούνται, γεγονός που εξυπηρετεί στην αποφυγή της διάσπασης του DNA). Ανακινούμε ισχυρά και επωάζουμε για 15-30min, σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθέτουμε 750μl SDS (10% w/v) και 100μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) (το SDS είναι ένα ανιονικό αποδιατακτικό που δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει τη δομή της μεμβράνης του πυρήνα, ενώ συμμετέχει στην αποδιάταξη της χρωματίνης και των πρωτεϊνών. Επίσης, με την πρωτεΐνάση K επιτυγχάνεται η διάσπαση και η πέψη των πρωτεϊνών, με τις οποίες είναι συνδεδεμένο το DNA).
10. Επώαση στους 37°C για 16-18hrs (overnight-O/N).

2η μέρα

Προσθέτουμε 2ml 6M κεκορεσμένου διαλύματος NaCl. Αναδεύουμε ισχυρά για 15sec (με τη διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα η κατακρήμνιση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών).

1. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 4°C.
2. Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο και απορρίπτουμε το ίζημα. Αναδεύουμε ισχυρά.

3. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 4°C.
4. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο των 50ml και απορρίπτουμε το ίζημα.
5. Ακολουθεί καταβύθιση του νουκλεϊκού οξέος, που βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα, με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης (2πλάσιο όγκο σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και CH₃COONa σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του αρχικού διαλύματος. Σε περίπτωση που η αρχική ποσότητα του δείγματος του αίματος είναι αρκετή, δεν χρειάζεται να προσθέσουμε CH₃COONa
6. Επώαση στους -20°C O/N.

3η μέρα

1. Φυγοκεντρούμε για 50min στις 3500rpm, στους 4°C.
2. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Το DNA που συλλέγεται «ξεπλένεται» με διάλυμα αιθανόλης 70% και εισάγεται σε σωληνάριο τύπου erpendorf (το συγκεκριμένο βήμα καθαρισμού χρειάζεται για την απομάκρυνση του άλατος που έχει παραμείνει στο διάλυμα).
3. Φυγοκεντρούμε για 30min στις 12000rpm, στους 4°C.
4. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 2 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρωσης είναι 20min.
5. Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο (αιθανόλη) προσεκτικά, (αφήνουμε μόνο το ίζημα-DNA) και καλύπτουμε το σωληνάριο με παραφίλμ, το οποίο τρυπάμε με μικροσκοπική καρφίτσα (με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η εξάτμιση της αιθανόλης που έχει παραμείνει στο σωληνάριο).
6. Επώαση σε θερμοκρασία ψυγείου.
7. Το DNA φυλάσσεται στους 4°C (για συχνή χρήση) ή στους -20°C (για μεγάλο χρονικό διάστημα).

Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA

A. Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης

Με μικρή ποσότητα DNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το DNA γίνεται ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία σε συσκευή UV. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο έλεγχος της ποιότητας του DNA.

B. Μέτρηση συγκέντρωσης

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης του DNA ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Το DNA ανιχνεύεται και προσδιορίζεται ποσοτικά με πολλούς τρόπους. Η απλούστερη μέθοδος περιλαμβάνει τον

υπολογισμό της συγκέντρωσής του με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να απορροφά εκλεκτικά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm.

Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) υδατικού διαλύματος DNA (αραιωμένο διάλυμα DNA 1:100) σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm σε κυψελίδα χαλαζία με διαδρομή φωτός 1cm. Η απορρόφηση στα 260nm αντιστοιχεί στο νουκλεϊκό οξύ που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280 nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις που έχουν παραμείνει στο διάλυμα.

Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται με βάση το λόγο OD_{260}/OD_{280} . Τιμές του λόγου μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA, τιμές μικρότερες του 1,7 φανερώνουν ότι το διάλυμα του DNA περιέχει πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA.

Έχει αποδειχθεί ότι σε μήκος κύματος 260nm τιμή OD ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50μg/ml δίκλωνου DNA. Βάσει αυτού του δεδομένου μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DNA μετά τη φωτομέτρηση ως εξής:

$$\text{Συγκέντρωση DNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{αραιώση} \times 50 \times \text{τιμή } OD_{260}$$

Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες DNA μέχρι και 0,2μg DNA/ml διαλύματος.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου) από ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος. Η τεχνική της PCR εκμεταλλεύεται δύο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: Το πρώτο είναι ότι η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Για το λόγο αυτό η αποδιάταξη του DNA είναι απαραίτητη για τη δράση της Taq DNA πολυμεράσης. Το δεύτερο είναι ότι για να μπορέσει η DNA πολυμεράση να αρχίσει τη σύνθεση χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA. Αυτό σημαίνει ότι αν μετά το διαχωρισμό των δύο αλυσίδων ενός μορίου DNA χρησιμοποιηθεί ένας εκκινητής που υβριδίζεται σε ένα σημείο της μιας αλυσίδας, τότε θα αρχίσει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας από το σημείο που υβριδίστηκε ο εκκινητής (primer). Επομένως, είναι δυνατόν να επιτευχθεί η ενίσχυση οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA επιλέγοντας δύο εκκινητές που υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου. Ο κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός προς κάθε μια από τις δύο αλυσίδες DNA και οι δύο μαζί καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος.

Η τεχνική της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρία στάδια και η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται εξολοκλήρου *in vitro* σε ένα σωληνάριο τύπου *erpendorf* με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή.

1^ο στάδιο: θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (denaturation)

2^ο στάδιο: σύνδεση εκκινητών, όπου οι δύο εκκινητές υβριδίζονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου (primer annealing)

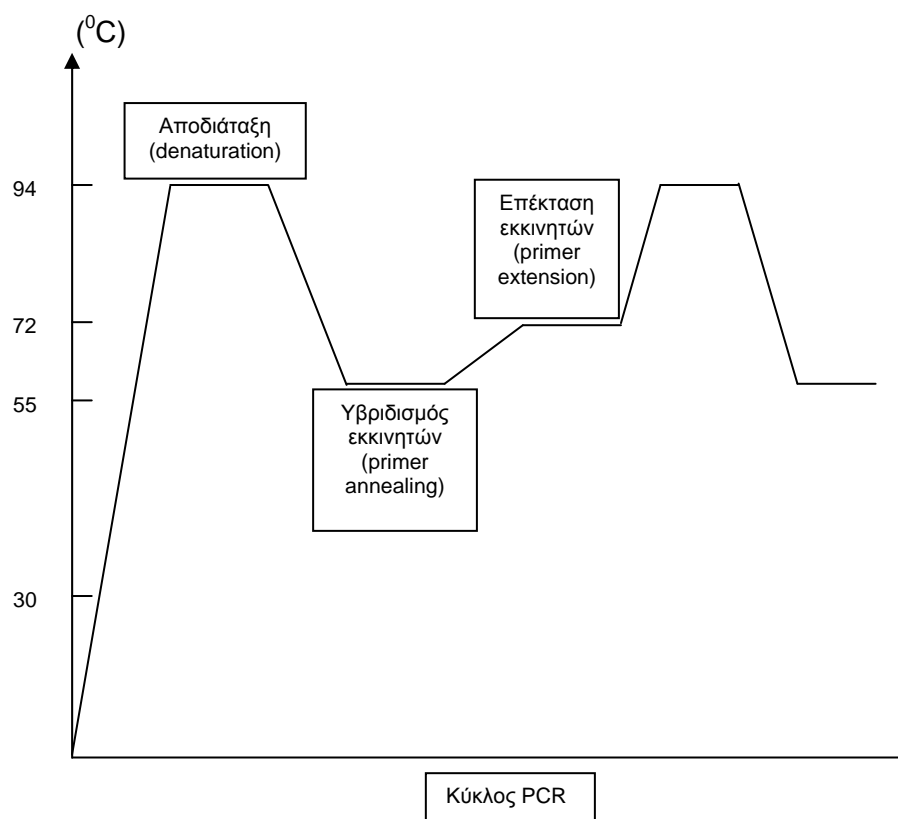
3^ο στάδιο: σύνθεση DNA, όπου παρουσία Ταq DNA πολυμεράσης και dNTPs, οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών με βάση την αλυσίδα DNA-εκμαγείο και οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται (extension). Η σύνθεση DNA γίνεται πάντοτε προς την κατεύθυνση 5'→3'.

Όπως παραστατικά φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, η τεχνική της PCR περιλαμβάνει μια επαναλαμβανόμενη εναλλαγή ανάμεσα σε μια υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, μια σχετικά χαμηλή θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών με συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου και μια ενδιάμεση θερμοκρασία για την επέκταση των εκκινητών (Διάγραμμα 1).

Διάγραμμα 1

Διάγραμμα θερμοκρασιακής εναλλαγής κατά τη διάρκεια ενός κύκλου PCR:

Θερμοκρασία



Αναμφισβήτητα, οι θερμοκρασίες για την PCR είναι κρίσιμες, οπότε σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι θερμοκυκλοποιητές (thermal cycler), οι οποίοι επιτυγχάνουν ακριβή ρύθμιση της θερμοκρασίας. Έχουν την ιδιότητα να επιτρέπουν την αυτοματοποιημένη εναλλαγή της θερμοκρασίας, σύμφωνα με θερμοκρασιακό προγραμματισμό. Επίσης, οι θερμικοί κυκλοποιητές παρέχουν ομοιόμορφη θέρμανση και ψύξη και εξασφαλίζουν τις ίδιες συνθήκες σε όλα τα σωληνάρια που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση της PCR. Έτσι, η θερμοκρασία σε κάθε σωληνάριο της αντίδρασης είναι ακριβής και επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες για τον υβριδισμό των εκκινητών, την αποδιάταξη και επέκταση του DNA.

Η επιλογή κατάλληλης θερμοκρασίας και χρόνου σε κάθε στάδιο της αντίδρασης σχετίζεται με την ειδικότητα της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, η επιλογή της θερμοκρασίας και του χρόνου αποδιάταξης εξαρτάται από το μήκος του DNA-στόχου και την περιεκτικότητά του σε G+C. Για παράδειγμα, υπόστρωμα DNA πλούσιο σε G+C απαιτεί υψηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης, λόγω της παρουσίας 3 δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (σε αντίθεση με το συμπληρωματικό ζεύγος A-T όπου αναπτύσσονται 2 δεσμοί υδρογόνου). Τυπικά, χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες 94-95°C για 3min πριν από τον πρώτο κύκλο για να εξασφαλιστεί η πλήρη αποδιάταξη του DNA-στόχου. Σε μεταγενέστερους κύκλους, τυπικές συνθήκες αποδιάταξης θεωρούνται οι θερμοκρασίες των 94 με 95°C για 30 με 60 sec. Χαμηλές θερμοκρασίες αποδιάταξης οδηγούν στη μη-ολική αποδιάταξη του DNA-στόχου και/ ή του PCR προϊόντος και εμποδίζουν την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του DNA. Αντίθετα, υψηλές θερμοκρασίες και/ή η μεγάλη διάρκεια αποδιάταξης προκαλούν αποδιάταξη της Taq DNA πολυμεράσης και απώλεια της ενεργότητάς της.

Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεών τους. Η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού ρυθμίζεται γενικά 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m) των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων. Θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 55 με 65°C, αποδίδουν τα καλύτερα αποτελέσματα. Η αύξηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης, αυξάνει την ειδικότητα του τελικού προϊόντος. Αυτό συμβαίνει επειδή επιτυγχάνεται ο περιορισμός της υβριδοποίησης των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων σε μη-ειδικές περιοχές του DNA και εμποδίζεται η προσθήκη λανθασμένων νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των εκκινητών. Εάν η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από τη βέλτιστη, τα προϊόντα της αντίδρασης συχνά περιλαμβάνουν επιπρόσθετα μη-ειδικά τμήματα DNA.

Ο χρόνος για την επέκταση των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου, καθώς και τη

θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για την αντίδραση επέκτασης. Συνήθως, ο πολυμερισμός των εκκινητών επιτελείται στους 72⁰C. Στη θερμοκρασία αυτή η Taq DNA πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο, ανάλογα με το pH, τη συγκέντρωση των ιόντων, το ρυθμιστικό διάλυμα και το είδος του υποστρώματος DNA. Το στάδιο επέκτασης των εκκινητών μπορεί να κυμαίνεται από 1 μέχρι 7 min, ανάλογα με το μήκος του DNA-στόχου που προορίζεται για ενίσχυση (>1Kb). Επιπλέον, διάρκεια επέκτασης μεγαλύτερη του 1 min είναι αναγκαία σε αρχικούς κύκλους πολυμερισμού αν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μικρή, ή στα τελικά στάδια όταν η συγκέντρωση του προϊόντος υπερτερεί της συγκέντρωσης του ενζύμου.

Για τη λειτουργία της μεθόδου είναι απαραίτητη η χρήση:

- Ειδικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA πολυμεράσης)
- Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία ονομάζονται μόρια-εκκινητές (primers)
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5´ τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂
- Ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την Taq DNA πολυμεράση
- Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του εκμαγείου- μήτρας.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά:

Το μόριο του DNA-στόχου υποστηρίζεται ότι για την PCR χρειάζεται τουλάχιστον ένα αντίγραφο του γονιδίου-στόχου για να εξασφαλιστεί η αντιγραφή του. Ο μεγαλύτερος αριθμός των αντιγράφων του DNA-στόχου ενισχύει την πιθανότητα ενός επιτυχούς πολλαπλασιασμού του DNA. Κάθε βλάβη, όπως η ύπαρξη σπασμένου DNA, εμποδίζει την αντίδραση της PCR. Επιπλέον η νουκλεοτιδική αλληλουχία-στόχος μπορεί να είναι άγνωστη, αρκεί να είναι γνωστές οι αλληλουχίες των δύο άκρων της, ώστε να σχεδιαστούν οι απαραίτητοι για τη μέθοδο εκκινητές.

Οι εκκινητές δεν θα πρέπει να συνδέονται με ανεπιθύμητες αλληλουχίες DNA για να επιτευχθεί εξειδικευμένη ενίσχυση του DNA-στόχου. Επίσης, πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G+C, η οποία να κυμαίνεται σε ποσοστό 40% με 60%. Συνήθως, το μήκος των εκκινητών υπολογίζεται από 15 μέχρι 30 νουκλεοτίδια χωρίς συμπληρωματική αλληλοεπικάλυψη στα 3´ άκρα τους. Η συγκέντρωσή τους θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0.1-0.2μM. Υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν την παραγωγή μη-ειδικών προϊόντων και οδηγούν στη δημιουργία διμερών (primer-

dimers) που χρησιμοποιούνται ως DNA-στόχοι. Τέλος, το ζεύγος των εκκινητών που απαιτείται για την ενίσχυση του DNA-στόχου θα πρέπει να διαθέτει παρόμοια θερμοκρασία τήξεως (T_m , melting temperature), ή πιο εξειδικευμένα, θερμοκρασία επαναδιάταξης (T_a , annealing temperature). Έχει αποδειχθεί ότι η θερμοκρασία τήξεως δίκλωνου DNA είναι συνάρτηση της αλληλουχίας του μορίου και κατά προσέγγιση υπολογίζεται με βάση την περιεκτικότητα του μορίου σε πουρίνες και πυριμιδίνες ως εξής:

$$T_m = (4 \cdot \text{αριθμός ζευγών βάσεων G+C}) + (2 \cdot \text{αριθμός ζευγών βάσεων A+T})$$

Επιθυμητές T_m κυμαίνονται μεταξύ 55-65°C.

Η Taq DNA-πολυμεράση που απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο, *Thermus aquaticus*, αντέχει επαναλαμβανόμενη έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA, οπότε δε χρειάζεται η προσθήκη νέου ενζύμου μετά από κάθε κύκλο PCR. Επίσης, είναι ενεργή σε θερμοκρασίες, όπου επιτελείται υβριδισμός των εκκινητών επί των συμπληρωματικών επιθυμητών αλληλουχιών. Το εύρος της συγκέντρωσης της Taq DNA πολυμεράσης θα πρέπει να κυμαίνεται στα 1-5U/100μl. Υψηλές συγκεντρώσεις οδηγούν στη δημιουργία μη-ειδικών προϊόντων, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλούν την παραγωγή ενός ανεπαρκούς ποσοστού επιθυμητού προϊόντος. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (temperature optimum) κυμαίνεται γύρω στους 72°C.

Επιπλέον, ελεύθερα 5'τριφωσφορικά δεοξυριβοζονουκλεοτίδια (dNTPs) απαιτούνται για τη σύνθεση του DNA. Τα τέσσερα dNTPs (dATP, dTTP, dCTP και dGTP) ενδείκνυται να χρησιμοποιούνται σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις και ανάλογες με την αντίστοιχη της πολυμεράσης, έτσι ώστε να εμποδίζεται η λανθασμένη πρόσδεση νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης. Έτσι, οι συγκεντρώσεις των dNTPs θα πρέπει να κυμαίνονται στα 20-200μM για κάθε δεοξυριβοζονουκλεοτίδιο.

Απαραίτητα για την PCR θεωρούνται και τα δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}). Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} επιδρά στον υβριδισμό-πρόσδεση των εκκινητών, στη θερμοκρασία τήξεως του DNA και στη δραστηριότητα του ενζύμου. Η βέλτιστη συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} είναι 1,5-2mM. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των ιόντων Mg^{2+} αυξάνουν τη συχνότητα λανθασμένης πρόσδεσης νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης.

Εκτός από τα αντιδραστήρια, τα οποία άμεσα περιλαμβάνονται στην αντίδραση, η PCR απαιτεί και ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει Tris-HCl και άλατα και καθορίζει το pH της αντίδρασης μεταξύ 8,3 και 8,9.

Στην παρούσα μελέτη το τμήμα του γονιδίου της ACT στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος (-15A/T) που περιέχει τον πολυμορφισμό ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινήτες:

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

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

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

PCR συνθήκες:	
94°C για 7min	} 35 κύκλοι
94°C για 30sec	
55°C για 30sec	
72°C για 45sec	
72°C για 7min	
4°C για ∞	

Επίσης, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σε τελικό όγκο 50μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
DNA (200ng/μl)	5.00 μl	0.02μgr
10× PCR buffer	5.00μl	1x
dNTPs (40mM)	1.00μl	0.8mM
Primer F (10μM)	1.00μl	0.2μM
Primer R (10μM)	1.00μl	0.2μM
MgCl ₂ (50mM)	1.70μl	1.7mM
Taq DNA Polymerase (5u/μl)	1.00μl	0.1u
ddH ₂ O	34.30μl	-
Τελικός όγκος (V _{TEΛ})	50.00μl	

Το τμήμα του **γονιδίου της IL-1ra** που περιέχει τον VNTR πολυμορφισμό και εντοπίζεται μέσα στο δεύτερο ιντρόνιο ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές:

Primer F: 5' **GCC CCT CAG CAA CAC TCC TAT** 3'

Primer R: 5' **CCC TGG TCC CCA CAA AAC TA** 3'

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

PCR συνθήκες:	
95°C για 7min	
95°C για 30sec	} 32 κύκλοι
56°C για 30sec	
72°C για 90sec	
72°C για 7min	
4°C για ∞	

Επίσης, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σε τελικό όγκο 25μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
DNA (200ng/μl)	2.50 μl	0.02μgr
10× PCR buffer	2.50μl	1x
dNTPs (40mM)	0.50μl	0.8mM
Primer F (10μM)	0.25μl	0.1μM
Primer R (10μM)	0.25μl	0.1μM
MgCl ₂ (50mM)	1.00μl	2mM
Taq DNA Polymerase (5u/μl)	0.25μl	1.25u
ddH ₂ O	17.75μl	-
Τελικός όγκος (V _{TEΛ})	25.00μl	

Το τμήμα του **γονιδίου της IL-1β** στη θέση -511 του υποκινητή (-511C/T) που περιέχει τον πολυμορφισμό ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές:

Primer F: 5' **TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC** 3'

Primer R: 5' **GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT** 3'

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

PCR συνθήκες:	
95°C για 3min	} 35 κύκλοι
95°C για 1min	
55°C για 1min	
74°C για 1min	
74°C για 6min	
4°C για ∞	

Επίσης, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σε τελικό όγκο 50μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
DNA (200ng/μl)	5.00 μl	0.02μgr
10× PCR buffer	5.00μl	1x
dNTPs (40mM)	1.50μl	1.2mM
Primer F (10μM)	1.00μl	0.2μM
Primer R (10μM)	1.00μl	0.2μM
MgCl ₂ (50mM)	2.00μl	2mM
Taq DNA Polymerase (5u/μl)	0.50μl	0.05u
ddH ₂ O	34.00μl	-
Τελικός όγκος (V _{TEΛ.})	50.00μl	

Το τμήμα του **γονιδίου της IL-1α** στη θέση -889 του υποκινητή (-889C/T) που περιέχει τον πολυμορφισμό ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές:

Primer F: 5' **GTT CTA CCA CCT GAA CTA GGC** 3'

Primer R: 5' **TTA CAT ATG AGC CTT CCA TG** 3'

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

PCR συνθήκες:	
94°C για 7min	} 35 κύκλοι
94°C για 1min	
50°C για 1min	
72°C για 1min	
72°C για 10min	
4°C για ∞	

Επίσης, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σε τελικό όγκο 50μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
DNA (200ng/μl)	5.00 μl	0.02μgr
10× PCR buffer	5.00μl	1x
dNTPs (40mM)	1.00μl	0.8mM
Primer F (10μM)	1.00μl	0.2μM
Primer R (10μM)	1.00μl	0.2μM
MgCl ₂ (50mM)	1.50μl	1.5mM
Taq DNA Polymerase (5u/μl)	0.50μl	0.05u
ddH ₂ O	35.00μl	-
Τελικός όγκος (V _{TEΛ.})	50.00μl	

Το τμήμα του **γονιδίου του ACE** στο ιντρόνιο 16 που περιέχει τον πολυμορφισμό (I/D) ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές, οι

οποίοι υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας παρεμβολής (insertion sequence)(258):

Primer upstream: 5' **CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT** 3'

Primer downstream: 5' **GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T** 3'

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

<u>PCR συνθήκες:</u>	
94°C για 4min	} 30 κύκλοι
94°C για 1min	
58°C για 1min	
72°C για 2min	
72°C για 7min	
4°C για ∞	

Επίσης, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σε τελικό όγκο 25μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
DNA (200ng/μl)	2.50 μl	0.02μgr
10× PCR buffer	2.50μl	1x
dNTPs (40mM)	0.50μl	0.8mM
Primer F (10μM)	1.00μl	0.4μM
Primer R (10μM)	1.00μl	0.4μM
MgCl ₂ (50mM)	1.125μl	2.25mM
Taq DNA Polymerase (5u/μl)	0.50μl	0.1u
ddH ₂ O	15.875μl	-
Τελικός όγκος (V _{TEΛ})	25.00μl	

Ωστόσο, με την παραπάνω ενζυμική ενίσχυση, είναι πιθανή η λανθασμένη γονοτύπηση των ετεροζυγωτών (ID γονότυπος), σε ποσοστό 4-5% του συνόλου

τους. Η ενδεχόμενη ενίσχυση του D αλληλομόρφου πιθανόν να προκαλέσει λανθασμένη ταξινόμηση των ID γονοτύπων σε DD.

Έτσι, ο DD γονότυπος επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με την εφαρμογή μιας δεύτερης, ανεξάρτητης PCR αντίδρασης, όπου χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών, ειδικό μόνο για το I αλληλόμορφο(408).

Primer downstream: 5' **GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T** 3'

Primer third: 5' **TTT GAG ACG GAG TCT CGC TC** 3'

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

PCR συνθήκες:	
93°C για 3min	
92°C για 1min	} 30 κύκλοι
61°C για 1min	
72°C για 1min	
72°C για 7min	
4°C για ∞	

Επίσης, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σε τελικό όγκο 25μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
DNA (200ng/μl)	2.50 μl	0.02μgr
10× PCR buffer	2.50μl	1x
DMSO	1.125μl	0,5x
dNTPs (40mM)	0.50μl	0.8mM
Primer F (10μM)	1.00μl	0.4μM
Primer R (10μM)	1.00μl	0.4μM
MgCl ₂ (50mM)	1.00μl	2.00mM
Taq DNA Polymerase (5u/μl)	0.50μl	0.1u
ddH ₂ O	14.875μl	-
Τελικός όγκος (V _{TEΛ})	25.00μl	

Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση ορίζεται ως η μετακίνηση ενός φορτισμένου μορίου υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Περιγράφεται από τον τύπο: $v = E \times z / f$. Όπου v είναι η ταχύτητα μετακίνησης κάθε μορίου, z το καθαρό φορτίο του μορίου, E η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και f ο συντελεστής τριβής. Είναι η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό του DNA με βάση το φορτίο και το μοριακό του βάρος. Στο συγκεκριμένο πειραματικό στάδιο πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης που αποτελεί καθιερωμένη μέθοδο για τον προσδιορισμό του μήκους και της καθαρότητας του DNA. Η μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίσει τμήματα DNA, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν ικανοποιητικά με άλλες τεχνικές.

Η αгарόζη, που απομονώνεται από φύκη, είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης. Ο πολυσακχαρίτης συνίσταται από D-γαλακτόζη και 3,6-άνυδρο-L-γαλακτόζη που συνδέονται με 1→4 γλυκοζιτικό δεσμό. Επίσης, ο σχηματισμός των πόρων είναι μια φυσική διαδικασία που προκύπτει από την αναδιάταξη των μορίων που την αποτελούν. Συνεπώς, η χαρακτηριστική ανομοιομορφία στο μέγεθος των πόρων οδηγεί σε μικρή διαχωριστική ικανότητα. Ωστόσο, όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα της πηκτής σε αгарόζη τόσο αυξάνεται και η ικανότητά της να διαχωρίζει μικρού μεγέθους μόρια. Οι πηκτές αгарόζης ηλεκτροφορούνται συνήθως οριζόντια σε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής ισχύος και κατεύθυνσης.

Η πηκτή αгарόζης παρασκευάζεται λιώνοντας την αгарόζη στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μέχρις ότου αυτό γίνει εντελώς διαυγές. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Tris- Βορικό-EDTA (1×TBE: 10mM Tris, 0.09M Βορικό οξύ, 0.5M EDTA) με pH περίπου 8, το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το TBE επιτυγχάνει καλό διαχωρισμό και έχει υψηλή ρυθμιστική ικανότητα.

Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή-εκμαγείο όπου και πήζει. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται είναι οριζόντιες και παρέχουν αρκετά πλεονεκτήματα όπως: (α) δυνατότητα χρησιμοποίησης χαμηλών συγκεντρώσεων αгарόζης, (β) εύκολη παρασκευή πηκτής με διαστάσεις που κάθε φορά απαιτούνται, (γ) εύκολη και γρήγορη κατασκευή και χρησιμοποίηση των πηκτών.

Ακολούθως, απαραίτητη θεωρείται η ανάμιξη του δείγματος DNA με μια χρωστική (βρωμοφαινόλη: 100mM EDTA , 20% w/v Ficoll, 1%Bromophenol blue). Με τον τρόπο αυτό το δείγμα γίνεται ορατό και διευκολύνεται η εισαγωγή του στην κατάλληλη περιοχή («πηγαδάκι») της πηκτής αгарόζης. Στη συνέχεια, όταν

εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο (90-100V) κατά μήκος της πηκτής, το DNA κατευθύνεται προς την άνοδο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA καθίσταται αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, λόγω της παρουσίας των φωσφορικών ομάδων.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA σε πηκτή αγαρόζης δεν είναι δυνατόν να γίνουν ορατές εκτός αν το DNA βαφεί με κάποιο τρόπο. Για το λόγο αυτό ακολουθεί εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Η ουσία αυτή παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Μετά την τοποθέτηση της πηκτής σε συσκευή UV, οι ζώνες του DNA είναι ορατές, γεγονός που οφείλεται στο φθορισμό της χρωστικής κάτω από την υπεριώδη ακτινοβολία. Ακολουθεί η φωτογράφιση του DNA.

Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση τόσο για τον έλεγχο ύπαρξης DNA μετά την διαδικασία απομόνωσης, όπως προαναφέρθηκε, όσο και για την ανίχνευση του προϊόντος της PCR και του προϊόντος της πέψης.

ACT

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (3%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Ο έλεγχος του μεγέθους του προϊόντος της PCR που ενισχύθηκε έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (pBR322 DNA-Msp I Digest ladder). Το προϊόν της PCR ήταν το αναμενόμενο, στα 124bp. Επίσης, όπως θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω, τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης *metaphor* (3%) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

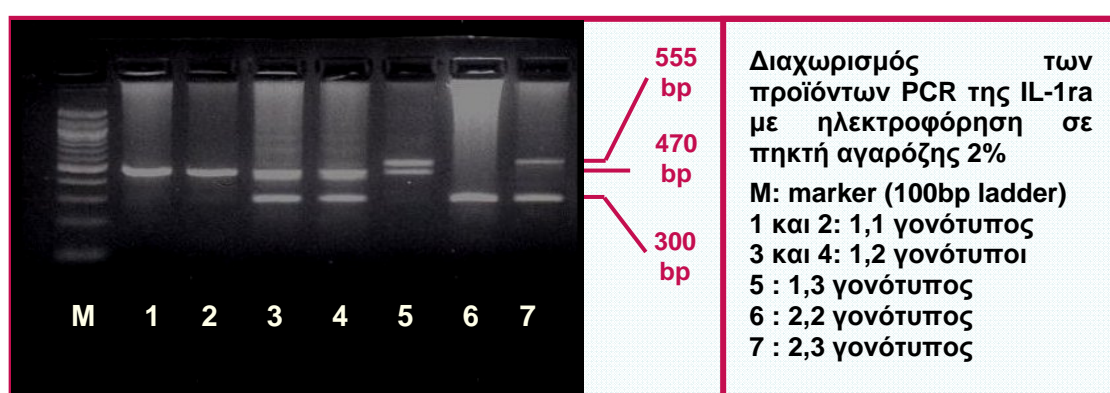
ACT*A	διάσπαση του PCR προϊόντος σε 3 τμήματα	84, 33 και 7bp
ACT*T	διάσπαση του PCR προϊόντος σε 2 τμήματα	117 και 7bp

IL-1ra

Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) και έγιναν ορατά με υπεριώδη ακτινοβολία. Ο έλεγχος του μεγέθους του προϊόντος της PCR που ενισχύθηκε έγινε

εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (100bp DNA Ladder). Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

Allele 1	4 repeats of 86bp	470bp
Allele 2	2 repeats	300bp
Allele 3	5 repeats	555bp
Allele 4	3 repeats	385bp
Allele 5	6 repeats	740bp



IL-1β(-511)

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη (2.5%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Ο έλεγχος του μεγέθους του προϊόντος της PCR που ενισχύθηκε έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (100bp DNA Ladder). Το προϊόν της PCR ήταν το αναμενόμενο, στα 304bp. Επίσης, όπως θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω, τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη (2.5%) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

Allele 1	διάσπαση του PCR προϊόντος σε 2 τμήματα	190 και 114bp
Allele2	μη διάσπαση του PCR προϊόντος	304bp

IL-1α(-889)

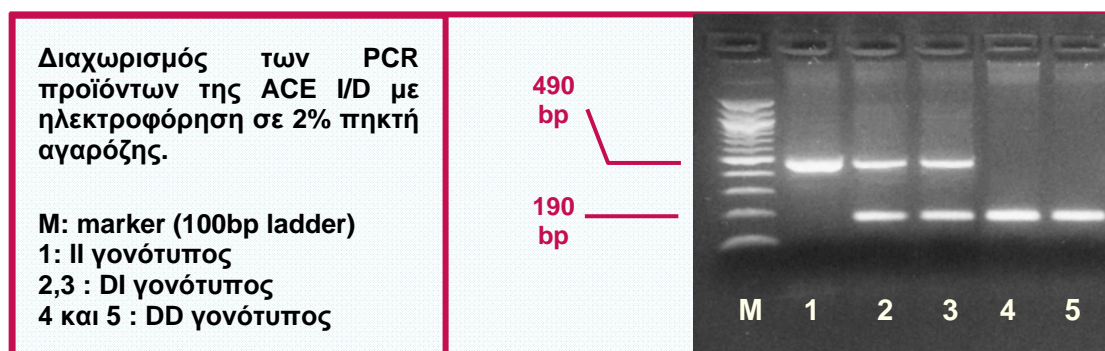
Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (4%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Ο έλεγχος του μεγέθους του προϊόντος της PCR που ενισχύθηκε έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (φΧ174 DNA/Hinf I Marker). Το προϊόν της PCR ήταν το αναμενόμενο, στα 99bp. Επίσης, όπως θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω, τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (4%) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

Allele T	μη διάσπαση του PCR προϊόντος	99 bp
Allele C	διάσπαση του PCR προϊόντος σε 2 τμήματα	83 και 16bp

ACE (I/D polymorphism)

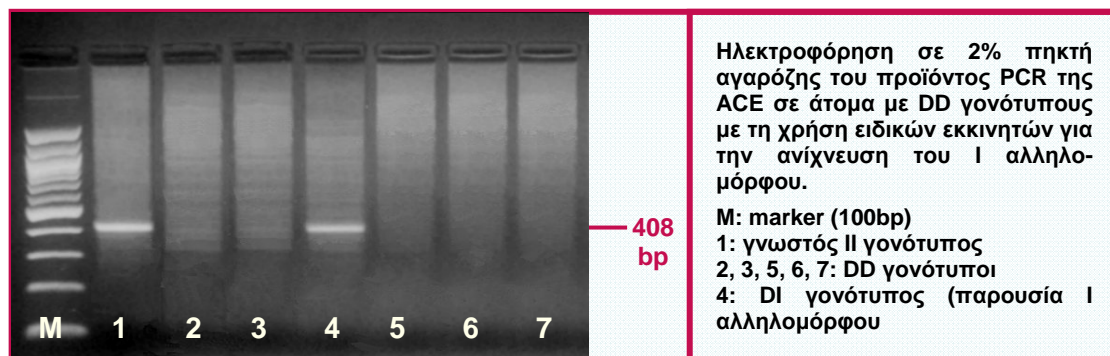
Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) και έγιναν ορατά με υπεριώδη ακτινοβολία. Ο έλεγχος του μεγέθους του προϊόντος της PCR που ενισχύθηκε έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (100bp DNA Ladder). Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

Allele I	παρουσία (Insertion) του τμήματος των 287bp	490bp
Allele D	απουσία (Deletion) του τμήματος των 287bp	190bp



Τέλος, τα προϊόντα της PCR για την επιβεβαίωση του DD γονότυπου ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (2%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) και έγιναν ορατά με υπεριώδη ακτινοβολία. Ο έλεγχος του μεγέθους του προϊόντος της PCR που ενισχύθηκε έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (100bp DNA Ladder).

DI γονότυπος	παρουσία (Insertion) του τμήματος των 287bp	408bp
-------------------------	--	-------



Πέψη με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που κόβουν, κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο, το δίκλωνο DNA, οποιαδήποτε κι αν είναι η προέλευσή του. Ο δεσμός που υδρολύουν οι ενδονουκλεάσες εντοπίζεται στο εσωτερικό του μορίου του DNA. Η δράση των ενζύμων αυτών επάγει τη μείωση με επαναλαμβανόμενο τρόπο ενός ολόκληρου γονιδιώματος σε μια σειρά από χαρακτηριστικά τμήματα ενός συγκεκριμένου DNA. Τα γονίδια ή τα τμήματα των γονιδίων καθίστανται έτσι φυσικές ενότητες που μπορούν να απομονωθούν και όχι πληροφορίες διασκορπισμένες μέσα σε ένα τεράστιο μοριακό σύνολο.

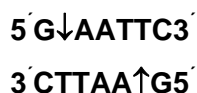
Από τη στιγμή της ανακάλυψης των ενζύμων περιορισμού υιοθετήθηκε μια διεθνής ονοματολογία, η οποία συνήθως φανερώνει την προέλευσή τους. Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο γράμμα είναι ένα κεφαλαίο που υποδηλώνει το πρώτο γράμμα του είδους του βακτηρίου από το οποίο προέρχεται το περιοριστικό ένζυμο. Τα δύο επόμενα γράμματα είναι μικρά και δηλώνουν το γένος του βακτηρίου. Τα τρία αυτά γράμματα ακολουθούνται από έναν λατινικό αριθμό που αντιπροσωπεύει τη σειρά ανακάλυψης του ενζύμου στο βακτήριο αυτό. Τέλος, εάν είναι απαραίτητο, προστίθεται ένα κεφαλαίο γράμμα που δηλώνει το στέλεχος του βακτηρίου.

Η κοινή ιδιότητα που χαρακτηρίζει όλα τα ένζυμα περιορισμού είναι ότι αναγνωρίζουν μια εξειδικευμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων στο DNA. Η δράση του ενζύμου μετά την αναγνώριση αυτή εξαρτάται από τον τύπο του. Διακρίνονται τρεις τύποι ενζύμων περιορισμού:

- Ένζυμα τύπου I: από τη στιγμή που αναγνωρίζουν την αλληλουχία, μετακινούνται επάνω στο DNA, σταματούν τυχαία 1000 έως 5000 ζεύγη βάσεων πιο μακριά από το σημείο αυτό και απελευθερώνουν μερικές δεκάδες νουκλεοτίδια.
- Ένζυμα τύπου II: αναγνωρίζουν την αλληλουχία και τέμνουν το DNA στο επίπεδο της αλληλουχίας αυτής.
- Ένζυμα τύπου III: αναγνωρίζουν μια αλληλουχία και τέμνουν το DNA είκοσι περίπου νουκλεοτίδια πιο μακριά

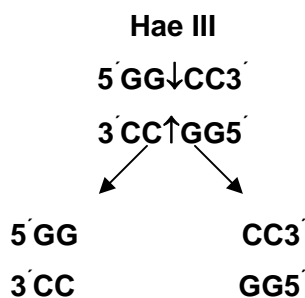
Μόνο τα ένζυμα τύπου II χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο και η δράση τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη σύσταση του διαλύματος επώασης και τη μοριακή σχέση του ενζύμου με το υπόστρωμα. Το μήκος των αλληλουχιών που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II κυμαίνεται μεταξύ 4 και 8 βάσεων (πιο συχνά 4 έως 6). Αν και οι ενδονουκλεάσες έχουν εξειδίκευση απέναντι σε βάσεις, για ορισμένα ένζυμα τύπου II, η εξειδίκευση για μια ή περισσότερες βάσεις, μπορεί να μην είναι απόλυτη. Ένα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των ενζύμων τύπου II είναι ότι οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν είναι παλίνδρομες. Αυτό σημαίνει ότι η αλληλουχία

είναι όμοια στις δύο αλυσίδες του DNA, όταν διαβάζονται με κατεύθυνση 5'→3' ή με κατεύθυνση 3'→5'. Η τομή επομένως γίνεται στο ίδιο σημείο και στις δύο αλυσίδες. Για παράδειγμα, το περιοριστικό ένζυμο Eco RI αναγνωρίζει και τέμνει ως εξής την παρακάτω αλληλουχία:



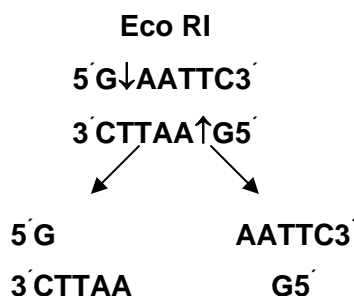
Τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II μπορούν να δώσουν δύο ειδών τμήματα:

➤ Τμήματα με ελεύθερα ή τυφλά άκρα (blunt or flush ends), δηλαδή άκρα χωρίς μονόκλωνες προεξοχές: στην περίπτωση αυτή το ένζυμο τέμνει ακριβώς στο ίδιο επίπεδο και τις δύο αλυσίδες του DNA. Παρακάτω αναφέρεται ένα παράδειγμα για το περιοριστικό ένζυμο Hae III που δημιουργεί τέτοιου είδους άκρα :



Μετά από μια τέτοιου τύπου τομή, δε μπορεί να γίνει αυτόματη ένωση των δύο τμημάτων που προκύπτουν, παρά μόνο μετά τη δράση του ενζύμου T4 λιγάση, η οποία σχηματίζει έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό ανάμεσα στην 5'-φωσφορυλ-ομάδα του ενός κομματιού και την 3'-υδροξυλ-ομάδα ενός άλλου κομματιού.

➤ Τμήματα με συνεκτικά ή συμπληρωματικά άκρα, δηλαδή άκρα με μονόκλωνες προεξοχές: σ' αυτήν την περίπτωση οι τομές μετατοπίζονται η μία σε σχέση με την άλλη στις δύο αλυσίδες. Παρακάτω αναφέρεται ένα παράδειγμα όπου το περιοριστικό ένζυμο Eco RI δημιουργεί τέτοιου είδους τμήματα:

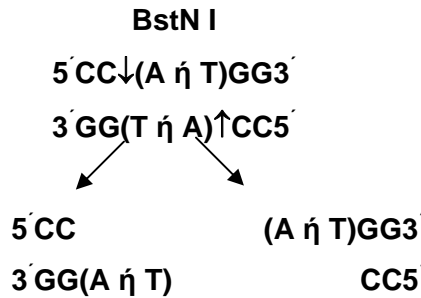


Μετά από μια τέτοιου τύπου τομή, οι δύο μονόκλωνες συμπληρωματικές ομάδες μπορούν να συζευχθούν. Η θερμοκρασία σύζευξης ενός τετρανουκλεοτιδίου κυμαίνεται στους 12 με 15°C.

ACT

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BstN I. Το BstN I είναι το πρώτο ένζυμο που απομονώθηκε από το βακτήριο *Bacillus stearothermophilus* N.

Η ενδονουκλεάση BstN I, που χρησιμοποιήθηκε, αναγνωρίζει και τέμνει ως εξής την παρακάτω αλληλουχία:



Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος της PCR σε τελικό όγκο 45μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
PCR product	35.00 μl	
Ένζυμο BstN I (10u/μl)	1.50 μl	0.33 u
BSA	0.45 μl	1x
10x NE Buffer 2	4.50 μl	1x
ddH ₂ O	3.55 μl	-
Τελικός όγκος (V _{TEΛ})	45.00 μl	

Το BSA (Bovine Serum Albumin: αλβουμίνη ελεύθερη νουκλεασών) χρησιμοποιείται στην περίπτωση αυτή, για την καλύτερη δράση και σταθεροποίηση του περιοριστικού ενζύμου.

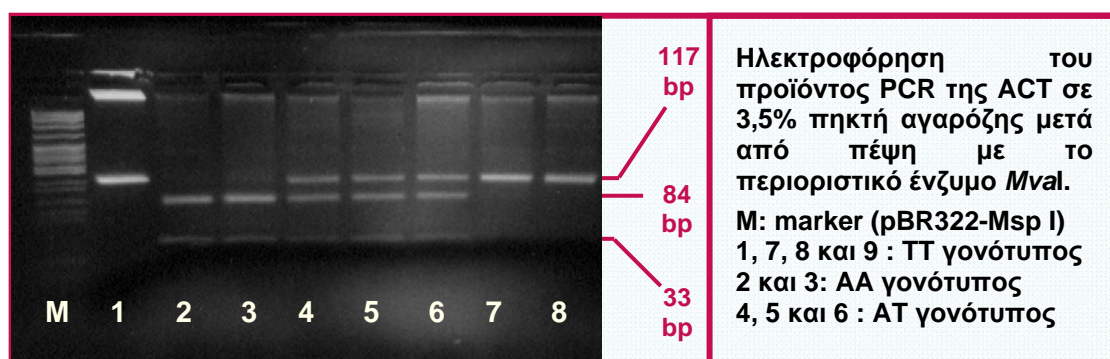
Μετά από επώαση για 16-18hrs (O/N) στους 37°C, τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης *metaphor* 3% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) με την εφαρμογή σταθερού ηλεκτρικού πεδίου 100V και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων της πέψης έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (pBR322 DNA-Msp I Digest ladder).

Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

➤ ACT*A (παρουσία Ala στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο BstN I τέμνει το προϊόν της PCR σε δύο σημεία, οπότε προκύπτουν 3 τμήματα (84, 33 και 7bp).

➤ ACT*T (παρουσία Thr στη θέση -15 του πεπτιδίου σήματος): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο BstN I τέμνει το προϊόν της PCR σε ένα σημείο, οπότε προκύπτουν 2 τμήματα (117 και 7bp).

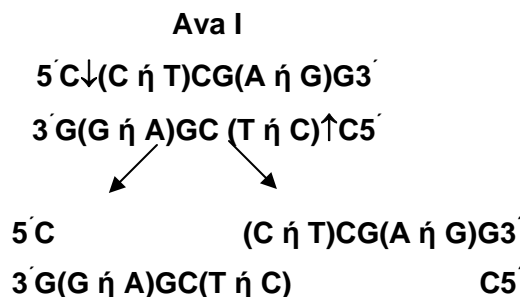
Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις τα τμήματα των 7bp και 33bp δεν είναι ορατά. Έτσι, το τμήμα των 84 bp υποδηλώνει την παρουσία του αλληλομόρφου ACT*A, ενώ το τμήμα των 117bp αντιπροσωπεύει την παρουσία του αλληλομόρφου ACT*T.



IL-1β(-511)

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Ava* I. Το *Ava* I είναι το πρώτο ένζυμο που απομονώθηκε από το βακτήριο *Anabaena variabilis*.

Η ενδονουκλεάση *Ava* I, που χρησιμοποιήθηκε, αναγνωρίζει και τέμνει ως εξής την παρακάτω αλληλουχία:



Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος της PCR σε τελικό όγκο 40μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
PCR product	30.00 µl	
Ένζυμο Ava I (10u/µl)	1.00 µl	0.25u
10x NE Buffer 2	4.00 µl	1x
ddH ₂ O	5.00 µl	-
Τελικός όγκος (V _{TEΛ})	40.00 µl	

Μετά από επώαση για 16-18hrs (O/N) στους 37°C, τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αгарόζης 2.5% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1µg/ml) με την εφαρμογή σταθερού ηλεκτρικού πεδίου 100V και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων της πέψης έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (100bp DNA Ladder).

Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

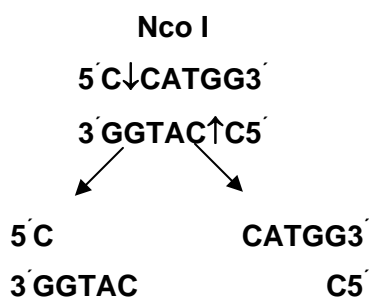
➤ IL1B-511*1 (παρουσία κυτοσίνης-C στη θέση -511 του υποκινητή του γονιδίου της IL-1B): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Ava I τέμνει το προϊόν της PCR σε ένα σημείο, οπότε προκύπτουν 2 τμήματα (190 και 114bp).

➤ IL1B-511*2 (παρουσία θυμίνης-T στη θέση -511 του υποκινητή του γονιδίου της IL-1B): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Ava I δεν τέμνει το προϊόν της PCR (304bp).



IL-1α(-889)

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Nco I. Το Nco I είναι το πρώτο ένζυμο που απομονώθηκε από το βακτήριο *Nocardia corallina*. Η ενδονουκλεάση Nco I, που χρησιμοποιήθηκε, αναγνωρίζει και τέμνει ως εξής την παρακάτω αλληλουχία:



Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος της PCR σε τελικό όγκο 45μl.

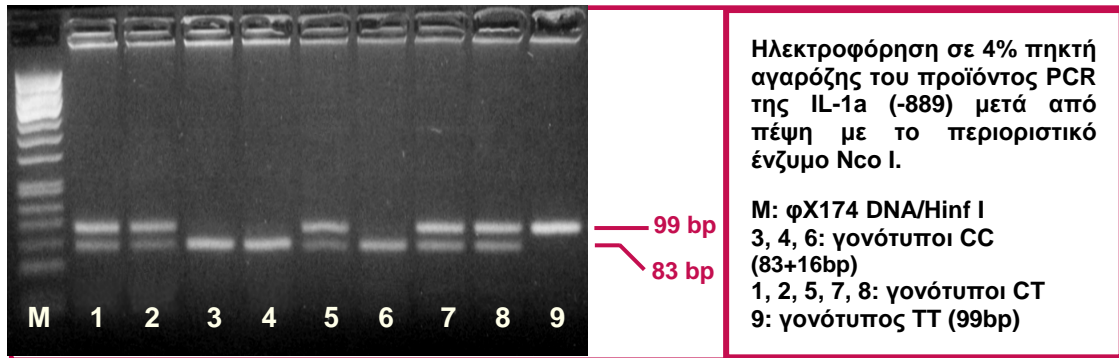
	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
PCR product	35.00 μl	
Ένζυμο Nco I (10u/μl)	1.50 μl	0.33u
10x NE Buffer 4	4.50 μl	1x
ddH ₂ O	4.00 μl	-
Τελικός όγκος (V _{TEΛ})	45.00 μl	

Μετά από επώαση για 16-18hrs (O/N) στους 37⁰C, τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αгарόζης 4% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) με την εφαρμογή σταθερού ηλεκτρικού πεδίου 100V και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων της πέψης έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (φX174 DNA/Hinf I Marker). Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

➤ IL1A-889*C (παρουσία κυτοσίνης-C στη θέση -889 του υποκινητή του γονιδίου της IL-1A): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Nco I τέμνει το προϊόν της PCR σε ένα σημείο, οπότε προκύπτουν 2 τμήματα (83 και 16bp).

➤ IL1A-889*T (παρουσία θυμίνης-T στη θέση -889 του υποκινητή του γονιδίου της IL-1A): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Nco I δεν τέμνει το προϊόν της PCR (99bp).

Ωστόσο, το τμήμα των 16bp δεν είναι ορατό. Έτσι, το τμήμα των 83 bp υποδηλώνει την παρουσία του αλληλομόρφου IL1A-889*C.



Αποτελέσματα

Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΠΕΑ και των φυσιολογικών μαρτύρων φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί. Συνολικά συλλέχθηκαν 178 ασθενείς με ΠΕΑ και 206 φυσιολογικοί μάρτυρες. Η μέση (mean) ηλικία των ασθενών με ΠΕΑ ήταν $64,1 \pm 13,9$ έτη και η οποία δε διέφερε σημαντικά από αυτή των φυσιολογικών μαρτύρων ($63,0 \pm 14,2$). Επίσης δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά το φύλο.

Ωστόσο, υπήρχε αυξημένη συχνότητα της υπέρτασης, της υπερλιπιδαιμίας και του καπνίσματος στους ασθενείς απ' ότι στους μάρτυρες. Αυτοί οι παράγοντες κινδύνου για πρόκληση ΠΕΑ έχουν κατ' επανάληψη αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία(1, 3, 155).

Οι ασθενείς επίσης κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την εντόπιση της ΕΑ. Ποσοστό 32,6% των ασθενών είχαν εντόπιση της αιμορραγίας στους λοβούς, ενώ οι υπόλοιποι (67,4%) είχαν εντόπιση στις εν τω βάθει δομές του εγκεφάλου. Ποσοστό 39,8% των ασθενών είχε γενικά μεγάλη αιμορραγία (όγκος αιματώματος >30ml). Ο όγκος του αιματώματος μετρήθηκε με τον τύπο ABC/2 (όπου Α, Β, C οι διάμετροι του αιματώματος στην αξονική τομογραφία εγκεφάλου) και δεν είχε διαφορά ανάμεσα στους εξεταστές που πραγματοποίησαν τη μέτρηση (intraindividual correlation=0.985 και interindividual correlation=0.956). Ο χρόνος μέτρησης του αιματώματος από τους εξεταστές ήταν μικρότερος του ενός λεπτού.

Σε σχέση με την κλινική εικόνα εισόδου 35,5% των ασθενών είχε βαριά κλινική εικόνα ($GCS \leq 8$), 17,9% είχε κλίμακα κώματος της Γλασκώβης 9-12 και 46,6% των ασθενών είχε καλή κλινική εικόνα κατά την είσοδο στο Νοσοκομείο ($GCS 13-15$).

Τέλος οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την τροποποιημένη κλίμακα του Rankin σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την κλινική εικόνα 6 μήνες μετά το επεισόδιο της ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας. 45,5% των ασθενών είχε ευνοϊκή 6μηνη έκβαση που σημαίνει ότι είχαν λειτουργική ανεξαρτησία στις καθημερινές δραστηριότητες, ενώ 54,5% των ασθενών είχαν μη ευνοϊκή έκβαση.

Πίνακας: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων				
		Ασθενείς n=178 (%)	Φυσιολογικοί μάρτυρες n=206 (%)	p
Μέση ηλικία (SD), έτη		64,1 (13,9)	63,0 (14,2)	0,53
Θήλυ (%)		66 (37,1)	78 (37,9)	0,87
Υπέρταση (%)		139 (78,1)	65 (31,6)	<0,0001
Στεφανιαία νόσος (%)		24 (13,4)	22 (10,7)	0,39
Σακχαρώδης διαβήτης		23 (12,9)	27 (13,1)	0,95
Υπερλιπιδαιμία (%)		58 (32,6)	38 (18,4)	0,001
Κάπνισμα (%)		45 (25,3)	28 (13,6)	0,003
Αλκοόλ (%)		51 (28,6)	62 (30,1)	0,75
Εντόπιση αιμορραγίας				
λοβώδης (%)		58 (32,6)		
μη λοβώδης (%)		120 (67,4)		
Όγκος αιμορραγίας:				
≤30ml(%)		103 (57,8)		
>30ml(%)		71 (39,8)		
GCS εισαγωγής				
3-8 (%)		63(35,5)		
9-12 (%)		32(17,9)		
13-15 (%)		83 (46,6)		
6μηνη έκβαση mRS				
ευνοϊκή (%)		81 (45,5)		
μη ευνοϊκή (%)		97 (54,5)		
SD= τυπική απόκλιση, GCS=κλίμακα κώματος της Γλασκώβης, mRS= τροποποιημένη κλίμακα έκβασης Rankin,				

Στους επόμενους πίνακες (1-5) καταγράφονται οι κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των εξετασθέντων γονιδίων στους ασθενείς και τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Επίσης αναλύονται και οι ακόλουθες υποκατηγορίες ασθενών: υπερτασικοί μη-υπερτασικοί, λοβώδης μη-λοβώδης εντόπιση της αιμορραγίας, όγκος της αιμορραγίας (>30ml, <30ml), κλίμακα κώματος της Γλασκώβης κατά την είσοδο του ασθενούς (3-8, 9-12, 13-15), και έκβαση ανάλογα με την τροποποιημένη κλίμακα έκβασης του Rankin (ευνοϊκή, μη ευνοϊκή έκβαση). Για την περίπτωση του πολυμορφισμού του μετατρεπτικού ενζύμου οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο επιπλέον ομάδες ανάλογα τη λήψη ή όχι αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου. Οι ασθενείς σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες και οι διάφορες υποκατηγορίες ασθενών βρισκόταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg, γεγονός που υποδηλώνει ότι το δείγμα των ασθενών που μελετήθηκε ήταν αντιπροσωπευτικό του γενικότερου πληθυσμού και επιπλέον υποδηλώνει μεγάλη αξιοπιστία της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε για την εργαστηριακή γενετική ανάλυση.

Στους πίνακες 6-10 καταγράφονται οι αναλύσεις των συσχετίσεων των εξετασθέντων πολυμορφισμών στους ασθενείς και τους φυσιολογικούς μάρτυρες και τις διάφορες υποομάδες. Ελέγχεται η επίδραση των γονοτύπων όσο και των αλληλομόρφων με βάση το επικρατητικό ή το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται πριν και μετά τη σταθεροποίηση με το μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression analysis) όπου γίνεται σταθεροποίηση για συνυπάρχοντες παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΕΑ, όπως ηλικία, φύλο, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, σακχαρώδη διαβήτη, ισχαιμική καρδιοπάθεια, κάπνισμα και λήψη αλκοόλ. Στην εξέταση της επίδρασης των πολυμορφισμών στην έκβαση (mRS) των ασθενών μετά από ΕΑ γίνεται επιπλέον σταθεροποίηση για την Γλασκώβη εισόδου (GCS).

Για τον πολυμορφισμό της ACT ο γονότυπος TT στο υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης ΕΑ στους ασθενείς χωρίς αρτηριακή πίεση OR (95% confidence intervals)=2.57 (1.02-6.51) $p=0.05$. Στο μοντέλο επικρατητικής κληρονόμησης υπάρχει μια τάση για συσχέτιση του γονοτύπου TT (OR (95% C.I.)= 0.61 (0.35-1.07), $p=0.08$). Παρόμοιες τάσεις παρατηρήθηκαν για τις υποκατηγορίες της μη-λοβώδους αιμορραγίας [OR (95% C.I.)=0.55 (0.28-1.06)] και του μεγάλου όγκου του αιματώματος [OR (95% C.I.)=0.54 (0.26-1.10)].

Όταν εξετάσαμε για την επίδραση του αριθμού των αλληλομόρφων T για την πρόκληση ΕΑ φάνηκε ότι η παρουσία ενός αλληλομόρφου T σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ΕΑ στο σύνολο των ασθενών με ΕΑ. Δεν παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα για τις υπόλοιπες υποκατηγορίες.

Για τους πολυμορφισμούς του ACE και των εξετασθέντων ιντερλευκινών οι συχνότητες των γονιδίων και των αλληλομόρφων δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ασθενών ή των υποκατηγοριών τους και των φυσιολογικών μαρτύρων. Το αποτέλεσμα αυτό δε φαίνεται να επηρεάζεται από το υπολειπόμενο ή επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης.

Όλοι οι πολυμορφισμοί δε βρέθηκε να σχετίζονται με την ηλικία έναρξης των ασθενών με ΕΑ. Επιπλέον, ελέγχθηκε μια ομάδα ασθενών που είχε ΕΑ από πιθανή ΑΑ. Η ομάδα αυτή των ασθενών ήταν αυτοί που είχαν λοβώδη αιμορραγία αλλά ήταν ταυτόχρονα μη υπερτασικοί. Και σε αυτήν την κατηγορία των ασθενών δε βρέθηκε επίδραση των πολυμορφισμών των εξετασθέντων γονιδίων.

Πίνακας 1: κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της ACT (-15A/T)											
	Γονότυποι						Αλληλόμορφα				
	AA	%	AT	%	TT	%	A	%	"T"	%	
Ασθενείς (n=147)	42	28,57%	68	46,26%	37	25,17%	152	51,70%	142	48,30%	
Μάρτυρες (n=208)	51	24,52%	113	54,33%	44	21,15%	215	51,68%	201	48,32%	
Υπερτασικοί (n=114)	31	27,19%	57	50,00%	26	22,81%	119	52,19%	109	47,81%	
Μη υπερτασικοί (n=33)	11	33,33%	11	33,33%	11	33,33%	33	50,00%	33	50,00%	
Λοβώδης (n=49)	13	26,53%	23	46,94%	13	26,53%	49	50,00%	49	50,00%	
Μη λοβώδης (n=98)	29	29,59%	45	45,92%	24	24,49%	103	52,55%	93	47,45%	
Μέγεθος≤30 (n=81)	20	24,69%	38	46,91%	23	28,40%	78	48,15%	84	51,85%	
Μέγεθος>30 (n=62)	21	33,87%	28	45,16%	13	20,97%	70	56,45%	54	43,55%	
GCS 3-8 (n=54)	15	27,78%	24	44,44%	15	27,78%	54	50,00%	54	50,00%	
GCS 9-12 (n=26)	10	38,46%	13	50,00%	3	11,54%	33	63,46%	19	36,54%	
GCS 13-15 (n=67)	17	25,37%	31	46,27%	19	28,36%	65	48,51%	69	51,49%	
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση (n=65)	21	32,31%	26	40,00%	18	27,69%	68	52,31%	62	47,69%	
Μη ευνοϊκή (n=82)	21	25,61%	42	51,22%	19	23,17%	84	51,22%	80	48,78%	

Πίνακας 2: κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού του ACE (I/D στο ιντρόνιο 16)										
	Γονότυποι						Αλληλόμορφα			
	DD	%	DI	%	II	%	D	%	I	%
Ασθενείς (n=178)	72	40,45%	79	44,38%	27	15,17%	223	62,64%	133	37,36%
Ασθενείς χωρίς ACE inhibitors(n=151)	61	40,40%	66	43,71%	24	15,89%	188	62,25%	114	37,75%
Μάρτυρες (n=208)	89	42,79%	90	43,27%	29	13,94%	268	64,42%	148	35,58%
Λοβώδης (n=58)	24	41,38%	28	48,28%	6	10,34%	76	65,52%	40	34,48%
Μη λοβώδης (n=120)	48	40,00%	51	42,50%	21	17,50%	147	61,25%	93	38,75%
Μέγεθος≤30 (n=103)	42	40,78%	45	43,69%	16	15,53%	129	62,62%	77	37,38%
Μέγεθος>30 (n=71)	26	36,62%	34	47,89%	11	15,49%	86	60,56%	56	39,44%
GCS 3-8 (n=63)	27	42,86%	23	36,51%	13	20,63%	77	61,11%	49	38,89%
GCS 9-12 (n=32)	12	37,50%	16	50,00%	4	12,50%	40	62,50%	24	37,50%
GCS 13-15 (n=83)	33	39,76%	40	48,19%	10	12,05%	106	63,86%	60	36,14%
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση (n=81)	29	35,80%	38	46,91%	14	17,28%	96	59,26%	66	40,74%
Μη ευνοϊκή (n=97)	43	44,33%	41	42,27%	13	13,40%	127	65,46%	67	34,54%

Πίνακας 3: κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της IL-1α (-899)										
	Γονότυποι						Αλληλόμορφα			
	CC	%	CT	%	TT	%	C	%	T	%
Ασθενείς (n=178)	81	45,51%	75	42,13%	22	12,36%	237	66,57%	119	33,43%
Μάρτυρες (n=208)	103	49,52%	82	39,42%	23	11,06%	288	69,23%	128	30,77%
Λοβώδης (n=58)	29	50,00%	23	39,66%	6	10,34%	81	69,83%	35	30,17%
Μη λοβώδης (n=120)	52	43,33%	52	43,33%	16	13,33%	156	65,00%	84	35,00%
Μέγεθος≤30 (n=103)	42	40,78%	45	43,69%	16	15,53%	129	62,62%	77	37,38%
Μέγεθος>30 (n=71)	38	53,52%	28	39,44%	5	7,04%	104	73,24%	38	26,76%
GCS 3-8 (n=63)	34	53,97%	21	33,33%	8	12,70%	89	70,63%	37	29,37%
GCS 9-12 (n=32)	13	40,63%	16	50,00%	3	9,38%	42	65,63%	22	34,38%
GCS 13-15 (n=83)	34	40,96%	38	45,78%	11	13,25%	106	63,86%	60	36,14%
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση (n=81)	34	41,98%	38	46,91%	9	11,11%	106	65,43%	56	34,57%
Μη ευνοϊκή (n=97)	47	48,45%	37	38,14%	13	13,40%	131	67,53%	63	32,47%

Πίνακας 4: κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της της IL-1β (-511)											
	Γονότυποι							Αλληλόμορφα			
	1.1	%	1.2	%	2.2	%		1	%	2	%
Ασθενείς (n=178)	78	43,82%	82	46,07%	18	10,11%	238	66,85%	118	33,15%	
Μάρτυρες (n=208)	85	40,87%	96	46,15%	27	12,98%	266	63,94%	150	36,06%	
Λοβώδης (n=58)	25	43,10%	29	50,00%	4	6,90%	79	68,10%	37	31,90%	
Μη λοβώδης (n=120)	53	44,17%	53	44,17%	14	11,67%	159	66,25%	81	33,75%	
Μέγεθος≤30 (n=103)	50	48,54%	42	40,78%	11	10,68%	142	68,93%	64	31,07%	
Μέγεθος>30 (n=71)	25	35,21%	39	54,93%	7	9,86%	89	62,68%	53	37,32%	
GCS 3-8 (n=63)	21	33,33%	35	55,56%	7	11,11%	77	61,11%	49	38,89%	
GCS 9-12 (n=32)	16	50,00%	14	43,75%	2	6,25%	46	71,88%	18	28,13%	
GCS 13-15 (n=83)	41	49,40%	33	39,76%	9	10,84%	115	69,28%	51	30,72%	
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση (n=81)	38	46,91%	32	39,51%	11	13,58%	108	66,67%	54	33,33%	
Μη ευνοϊκή (n=97)	40	41,24%	50	51,55%	7	7,22%	130	67,01%	64	32,99%	

Πίνακας 5: κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της της IL-1Ra (VNTR στο ιντρόνιο 2)														
	Γονότυποι								Αλληλόμορφα					
	1.1	%	1.3	%	1.2	%	2.2	%	1	%	2	%	3	%
Ασθενείς (n=178)	86	48,31%	14	7,87%	59	33,15%	19	10,67%	245	68,82%	97	27,25%	14	3,93%
Μάρτυρες (n=208)	111	53,37%	9	4,33%	70	33,65%	18	8,65%	301	72,36%	106	25,48%	9	2,16%
Λοβώδης (n=58)	31	53,45%	1	1,72%	22	37,93%	4	6,90%	85	73,28%	30	25,86%	1	0,86%
Μη λοβώδης (n=120)	55	45,83%	13	10,83%	37	30,83%	15	12,50%	160	66,67%	67	27,92%	13	5,42%
Μέγεθος≤30 (n=103)	48	46,60%	9	8,74%	34	33,01%	12	11,65%	139	67,48%	58	28,16%	9	4,37%
Μέγεθος>30 (n=71)	34	47,89%	5	7,04%	25	35,21%	7	9,86%	98	69,01%	39	27,46%	5	3,52%
GCS 3-8 (n=63)	26	41,27%	5	7,94%	23	36,51%	9	14,29%	80	63,49%	41	32,54%	5	3,97%
GCS 9-12 (n=32)	15	46,88%	2	6,25%	11	34,38%	4	12,50%	43	67,19%	19	29,69%	2	3,13%
GCS 13-15 (n=83)	45	54,22%	7	8,43%	25	30,12%	6	7,23%	122	73,49%	37	22,29%	7	4,22%
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση (n=81)	42	51,85%	7	8,64%	23	28,40%	9	11,11%	114	70,37%	41	25,31%	7	4,32%
Μη ευνοϊκή (n=97)	44	45,36%	7	7,22%	36	37,11%	10	10,31%	131	67,53%	56	28,87%	7	3,61%

Πίνακας 6: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της ACT							
	Μη στεθεροποιημένο			Σταθεροποιημένο ^(α) ^(β)			
	OR	95% C.I.	p	OR	95% C.I.	p	
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο T (TT vs AT+AA)							
Ασθενείς	1.24	0.75-2.04	0.40		1.14	0.64-2.01	0.65
Υπερτασικοί	0.72	0.36-1.43	0.34		0.71	0.35-1.46	0.35
Μη υπερτασικοί	2.32	1.00-5.40	0.05		2.57	1.02-6.51	0.05
Λοβώδης	1.33	0.65-2.72	0.44		1.20	0.56-2.56	0.65
Μη λοβώδης	1.19	0.68-2.11	0.54		1.00	0.52-1.95	0.99
Μέγεθος≤30	1.47	0.83-2.63	0.19		1.25	0.65-2.40	0.51
Μέγεθος>30	0.96	0.48-1.92	0.90		0.84	0.39-1.80	0.65
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	0.34	0.09-1.30	0.11		0.27	0.06-1.16	0.08
GCS 13-15	1.03	0.46-2.29	0.94		1.10	0.48-2.52	0.82
Ευνοϊκή δμνην έκβαση	R				R		
Μη ευνοϊκή	0.79	0.37-1.66	0.53		0.82	0.36-1.83	0.62
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο A (TT+TA vs AA)							
Ασθενείς	0.76	0.47-1.23	0.27		0.61	0.35-1.07	0.08
Υπερτασικοί	0.55	0.25-1.18	0.12		0.58	0.26-1.29	0.18
Μη υπερτασικοί	0.71	0.32-1.61	0.41		0.61	0.26-1.48	0.28
Λοβώδης	0.84	0.41-1.71	0.63		0.77	0.36-1.68	0.52
Μη λοβώδης	0.72	0.42-1.24	0.24		0.55	0.28-1.06	0.07
Μέγεθος≤30	0.91	0.51-1.64	0.76		0.68	0.34-1.34	0.26
Μέγεθος>30	0.61	0.33-1.12	0.11		0.54	0.26-1.10	0.09
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	0.62	0.23-1.66	0.34		0.67	0.22-2.01	0.48
GCS 13-15	1.13	0.50-2.55	0.77		1.21	0.51-2.87	0.66
Ευνοϊκή δμνην έκβαση	R				R		
Μη ευνοϊκή	1.39	0.68-2.84	0.37		1.23	0.56-2.69	0.61
Μοντέλο δοσοεξαρτώμενης επίδρασης του αλληλομόρφου (1 T vs 0 T)(1) και (2 T vs 0 T)(2)							
Ασθενείς(1)	0.69	0.41-1.14	0.14		0.55	0.30-0.99	0.05
Ασθενείς(2)	0.96	0.53-1.76	0.90		0.76	0.38-1.53	0.76
Υπερτασικοί(1)	0.58	0.26-1.29	0.18		0.62	0.27-1.44	0.28
Υπερτασικοί(2)	0.49	0.20-1.20	0.12		0.51	0.20-1.30	0.16
Μη υπερτασικοί(1)	0.47	0.19-1.18	0.11		0.38	0.14-1.04	0.06
Μη υπερτασικοί(2)	1.48	0.56-3.93	0.43		1.44	0.49-4.22	1.44
Λοβώδης(1)	0.75	0.35-1.59	0.48		0.71	0.31-1.60	0.40
Λοβώδης(2)	1.09	0.46-2.61	0.85		0.94	0.37-2.40	0.90
Μη λοβώδης(1)	0.65	0.37-1.16	0.15		0.51	0.25-1.03	0.06
Μη λοβώδης(2)	0.90	0.46-1.78	0.77		0.64	0.28-1.44	0.28
Μέγεθος≤30(1)	0.78	0.42-1.47	0.44		0.59	0.29-1.23	0.16
Μέγεθος≤30(2)	1.25	0.61-2.55	0.55		0.87	0.38-1.98	0.74
Μέγεθος>30(1)	0.58	0.30-1.12	0.11		0.53	0.25-1.12	0.10
Μέγεθος>30(2)	0.68	0.30-1.51	0.34		0.55	0.22-1.37	0.20
^(α) Σταθεροποίηση για ηλικία φύλο, υπέρταση, στεφανιαία νόσο, υπερλιπιδαιμία, διαβήτη, αλκοόλ, κάπνισμα και ^(β) GCS και mRS για τη μελέτη της Γλασκώβης εισόδου και την δμνην έκβαση.							

Πίνακας 7: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της ACE							
	Μη σταθεροποιημένο			Σταθεροποιημένο ^(α) ^(β)			
	OR	95% C.I.	p		OR	95% C.I.	p
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο I (II vs DI+DD)							
Ασθενείς	1.10	0.63-1.95	0.73		1.08	0.58-1.82	0.75
Ασθενείς χωρίς ACE inhibitors	1.17	0.65-2.10	0.61		1.15	0.68-2.05	0.60
Λοβώδης	0.71	0.28-1.81	0.47		0.63	0.19-1.75	0.54
Μη λοβώδης	1.31	0.71-2.42	0.39		1.27	0.68-2.36	0.43
Μέγεθος≤30	1.13	0.59-2.20	0.71		1.08	0.56-2.13	0.76
Μέγεθος>30	1.13	0.53-2.40	0.75		1.09	0.48-2.35	0.73
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	0.55	0.16-1.85	0.33		0.51	0.13-1.82	0.29
GCS 13-15	0.53	0.21-1.29	0.16		0.55	0.26-1.33	0.48
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση	R				R		
Μη ευνοϊκή	0.74	0.33-1.68	0.47		0.78	0.28-1.73	0.55
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο I (II+DI vs DD)							
Ασθενείς	1.10	0.73-1.65	0.64		1.08	0.69-1.63	0.61
Ασθενείς χωρίς ACE inhibitors	1.10	0.72-1.69	0.65		1.09	0.68-1.66	0.63
Λοβώδης	1.06	0.59-1.91	0.85		1.03	0.45-1.78	0.71
Μη λοβώδης	1.12	0.71-1.77	0.62		1.08	0.62-1.57	0.55
Μέγεθος≤30	1.09	0.67-1.75	0.74		1.07	0.59-1.68	0.67
Μέγεθος>30	1.29	0.74-2.26	0.36		1.21	0.69-2.10	1.11
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	1.25	0.52-2.99	0.62		1.28	0.48-3.01	0.69
GCS 13-15	1.14	0.58-2.21	0.71		1.18	0.63-2.31	0.76
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση	R				R		
Μη ευνοϊκή	0.70	0.38-1.28	0.25		0.65	0.32-1.23	0.32
Μοντέλο δόσοεξαρτώμενης επίδρασης αλληλομόρφου (1 "I" vs 0 "I")(1) και (2 "I" vs 0 "I")(2)							
Ασθενείς(1)	1.08	0.70-1.67	0.71		1.06	0.65-1.63	0.67
Ασθενείς(2)	1.15	0.63-2.12	0.65		1.12	0.55-2.08	0.59
Ασθενείς χωρίς ACE inhibitors(1)	1.07	0.68-1.69	0.77		1.05	0.62-1.55	0.62
Ασθενείς χωρίς ACE inhibitors(2)	1.21	0.64-2.27	0.56		1.11	0.61-2.18	0.53
Λοβώδης(1)	1.15	0.62-2.14	0.65		1.11	0.58-2.22	0.58
Λοβώδης(2)	0.77	0.29-2.06	0.60		0.72	0.25-2.08	0.65
Μη λοβώδης(1)	1.05	0.64-1.72	0.84		0.92	0.51-1.58	0.92
Μη λοβώδης(2)	1.34	0.69-2.60	0.38		1.21	0.54-2.48	0.27
Μέγεθος≤30(1)	1.06	0.63-1.77	0.82		0.92	0.50-1.63	0.71
Μέγεθος≤30(2)	1.17	0.57-2.38	0.67		1.01	0.35-2.09	0.74
Μέγεθος>30(1)	1.29	0.72-2.33	0.39		1.24	0.69-2.28	0.37
Μέγεθος>30(2)	1.30	0.57-2.95	0.53		1.19	0.49-2.81	0.41

^(α)Σταθεροποίηση για ηλικία φύλο, υπέρταση, στεφανιαία νόσο, υπερλιπιδαιμία, διαβήτη, αλκοόλ, κάπνισμα και ^(β) GCS και mRS για τη μελέτη της Γλασκώβης εισόδου και την 6μηνη έκβαση.

Πίνακας 8: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-1α (-899)							
	Μη σταθεροποιημένο				Σταθεροποιημένο ^(α) ^(β)		
	OR	95% C.I.	p		OR	95% C.I.	p
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο T (TT vs CT+CC)							
Ασθενείς	1.13	0.61-2.11	0.69		1.03	0.55-2.02	0.81
Λοβώδης	0.93	0.36-2.40	0.88		0.76	0.22-2.29	0.97
Μη λοβώδης	1.24	0.63-2.45	0.54		1.12	0.48-2.31	0.63
Μέγεθος≤30	1.46	0.74-2.94	0.26		1.29	0.63-2.78	0.32
Μέγεθος>30	0.61	0.22-1.67	0.33		0.56	0.12-1.54	0.28
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	0.71	0.17-2.89	0.63		0.64	0.12-2.75	0.57
GCS 13-15	1.05	0.40-2.79	0.92		1.10	0.47-2.86	0.73
Ευνοϊκή έκβαση	R						
Μη ευνοϊκή	1.24	0.50-3.06	0.64		1.28	0.45-3.37	0.77
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο T (TT+TC vs CC)							
Ασθενείς	1.17	0.79-1.75	0.43		1.01	0.57-1.57	0.36
Λοβώδης	0.98	0.55-1.76	0.95		0.93	0.51-1.73	0.78
Μη λοβώδης	1.28	0.82-2.02	0.28		1.10	0.69-1.88	0.18
Μέγεθος≤30	1.42	0.88-2.30	0.15		1.19	0.74-2.10	0.13
Μέγεθος>30	0.85	0.50-1.46	0.56		0.78	0.42-1.37	0.52
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	1.71	0.72-4.06	0.23		1.75	0.67-4.12	0.27
GCS 13-15	1.69	0.87-3.27	0.12		1.73	0.92-3.34	0.10
Ευνοϊκή έκβαση	R				R		
Μη ευνοϊκή	0.77	0.42-1.39	0.39		0.71	0.36-1.33	0.45
Μοντέλο δόσοεξαρτώμενης επίδρασης του αλληλομόρφου (1 T vs 0 T)(1) και (2 T vs 0 T)(2)							
Ασθενείς(1)	1.16	0.76-1.78	0.49		1.05	0.65-1.68	0.42
Ασθενείς(2)	1.22	0.63-2.34	0.56		1.10	0.51-2.23	0.38
Λοβώδης(1)	0.99	0.54-1.85	0.99		0.92	0.49-2.40	0.93
Λοβώδης(2)	0.92	0.34-2.49	0.88		0.88	0.29-2.44	0.91
Μη λοβώδης(1)	1.24	0.78-2.03	0.35		1.11	0.63-1.95	0.27
Μη λοβώδης(2)	1.38	0.67-2.83	0.38		1.30	0.55-2.73	0.34
Μέγεθος≤30(1)	1.35	0.81-2.24	0.25		1.27	0.67-2.12	0.15
Μέγεθος≤30(2)	1.71	0.82-3.55	0.15		1.48	0.67-3.41	0.19
Μέγεθος>30(1)	0.93	0.52-1.63	0.79		0.91	0.49-1.58	0.77
Μέγεθος>30(2)	0.59	0.21-1.66	0.31		0.51	0.17-1.53	0.23
^(α) Σταθεροποίηση για ηλικία φύλο, υπέρταση, στεφανιαία νόσο, υπερλιπιδαιμία, διαβήτη, αλκοόλ, κάπνισμα και ^(β) GCS και mRS για τη μελέτη της Γλασκώβης εισόδου και την 6μηνη έκβαση.							

Πίνακας 9: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-1β (-511)							
	Μη στεθεροποιημένο			Σταθεροποιημένο ^(α) ^(β)			
	OR	95% C.I.	ρ	OR	95% C.I.	ρ	
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 (2.2 vs 1.2+1.1)							
Ασθενείς	0.75	0.40-1.42	0.38		0.66	0.51-1.53	0.42
Λοβώδης	0.50	0.17-1.48	0.20		0.48	0.17-1.49	0.22
Μη λοβώδης	0.88	0.44-1.76	0.73		0.85	0.41-1.73	0.76
Μέγεθος≤30	0.80	0.38-1.69	0.56		0.73	0.36-1.67	0.58
Μέγεθος>30	0.73	0.30-1.77	0.49		0.69	0.27-1.71	0.46
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	0.53	0.10-2.73	0.44		0.48	1.08-2.69	0.39
GCS 13-15	0.97	0.34-2.77	0.96		0.99	0.37-2.82	0.95
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση	R				R		
Μη ευνοϊκή	0.49	0.18-1.34	0.16		0.53	0.16-1.38	0.21
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 (2.2+2.1 vs 1.1)							
Ασθενείς	0.89	0.59-1.33	0.56		0.77	0.48-1.24	0.49
Λοβώδης	0.91	0.51-1.64	0.76		0.81	0.45-1.60	0,71
Μη λοβώδης	0.87	0.55-1.38	0.56		0.77	0.49-1.37	0.48
Μέγεθος≤30	0.73	0.45-1.18	0.20		0.69	0.39-1.09	0.11
Μέγεθος>30	1.27	0.73-2.23	0.40		1.20	0.66-2.13	0.32
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	0.50	0.21-1.19	0.12		0.55	0.19-1.23	0.15
GCS 13-15	0.51	0.26-1.10	0.06		0.59	0.30-1.15	0.07
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση	R				R		
Μη ευνοϊκή	1.26	0.69-2.28	0.45		1.23	0.66-2.23	0.47
Μοντέλο δόσοεξαρτώμενης επίδρασης του αλληλομόρφου (1 "2" vs 0 "2")(1) και (2 "2" vs 0 "2")(2)							
Ασθενείς(1)	0.93	0.61-1.42	0.74		0.88	0.57-1.39	0.71
Ασθενείς(2)	0.73	0.37-1.42	0.35		0.66	0.32-1.39	0.33
Λοβώδης(1)	1.03	0.56-1.89	0.93		0.98	0.53-1.92	0.91
Λοβώδης(2)	0.51	0.16-1.58	0.23		0.48	0.15-1.55	0.29
Μη λοβώδης(1)	0.88	0.55-1.43	0.62		0.77	0.46-1.38	0.52
Μη λοβώδης(2)	0.83	0.40-1.73	0.62		0.76	0.31-1.66	0.55
Μέγεθος≤30(1)	0.74	0.45-1.23	0.25		0.61	0.29-1.15	0.19
Μέγεθος≤30(2)	0.69	0.32-1.52	0.36		0.66	0.29-1.47	0.32
Μέγεθος>30(1)	1.38	0.77-2.47	0.27		1.34	0.73-2.41	0.22
Μέγεθος>30(2)	0.88	0.34-2.26	0.79		0.86	0.32-2.19	0.76
^(α) Σταθεροποίηση για ηλικία φύλο, υπέρταση, στεφανιαία νόσο, υπερλιπιδαιμία, διαβήτης, αλκοόλ, κάπνισμα και ^(β) GCS και mRS για τη μελέτη της Γλασκώβης εισόδου και την 6μηνη έκβαση.							

Πίνακας 10: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-1Ra							
	Μη στεθεροποιημένο			Σταθεροποιημένο ^(α) ^(β)			
	OR	95% C.I.	ρ	OR	95% C.I.	ρ	
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 (2.2 vs 1.2+1.1)							
Ασθενείς	1.32	0.67-2.60	0.43		1.27	0.62-2.54	0.47
Λοβώδης	0.76	0.25-2.34	0.63		0.71	0.21-2.28	0.66
Μη λοβώδης	1.64	0.79-3.40	0.18		1.58	0.72-3.33	0.22
Μέγεθος≤30	1.47	0.68-3.20	0.33		1.44	0.62-3.15	0.37
Μέγεθος>30	1.19	0.47-3.00	0.71		1.15	0.43-2.93	0.67
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	0.84	0.23-2.98	0.78		0.77	0.18-2.91	0.75
GCS 13-15	0.47	0.16-1.40	0.17		0.51	0.18-1.43	0.15
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση	R				R		
Μη ευνοϊκή	0.90	0.35-2.35	0.83		0.92	0.31-2.37	0.87
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 (2.2+2.1 vs 1.1)							
Ασθενείς	1.14	0.75-1.73	0.52		1.11	0.68-1.71	0.48
Λοβώδης	1.06	0.59-1.91	0.85		1.03	0.55-1.85	0.81
Μη λοβώδης	1.19	0.74-1.91	0.46		1.12	0.69-1.86	0.42
Μέγεθος≤30	1.21	0.74-1.98	0.45		1.19	0.70-2.02	0.43
Μέγεθος>30	1.19	0.68-2.07	0.55		1.16	0.65-2.05	0.52
GCS 3-8	R				R		
GCS 9-12	0.81	0.34-1.96	0.64		0.84	0.31-2.03	0.67
GCS 13-15	0.56	0.28-1.12	0.10		0.58	0.33-1.17	0.13
Ευνοϊκή 6μηνη έκβαση	R				R		
Μη ευνοϊκή	1.37	0.74-2.55	0.31		1.34	0.71-2.60	0.35
Μοντέλο δόσοεξαρτώμενης επίδρασης του αλληλομόρφου (1 "2" vs 0 "2")(1) και (2 "2" vs 0 "2")(2)							
Ασθενείς(1)	1.09	0.70-1.70	0.71		1.06	0.65-1.67	0.67
Ασθενείς(2)	1.36	0.67-2.75	0.39		1.33	0.63-2.71	0.36
Λοβώδης(1)	1.12	0.60-2.10	0.71		1.10	0.55-2.17	0.68
Λοβώδης(2)	0.80	0.25-2.52	0.70		0.74	0.23-2.45	0.73
Μη λοβώδης(1)	1.07	0.64-1.78	0.80		1.05	0.61-1.69	0.73
Μη λοβώδης(2)	1.68	0.79-3.59	0.18		1.66	0.75-3.45	0.16
Μέγεθος≤30(1)	1.12	0.66-1.91	0.67		1.09	0.63-1.87	0.64
Μέγεθος≤30(2)	1.54	0.69-3.45	0.26		1.51	0.65-3.37	0.20
Μέγεθος>30(1)	1.17	0.64-2.12	0.61		1.13	0.58-2.02	0.57
Μέγεθος>30(2)	1.27	0.49-3.29	0.62		1.22	0.47-3.22	0.59
^(α) Σταθεροποίηση για ηλικία φύλο, υπέρταση, στεφανιαία νόσο, υπερλιπιδαιμία, διαβήτης, αλκοόλ, κάπνισμα και ^(β) GCS και mRS για τη μελέτη της Γλασκώβης εισόδου και την 6μηνη έκβαση.							

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολυμορφισμός της ACT

Στην παθογένεση της ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας εμπλέκονται τόσο γενετικοί όσο και επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου(155). Κατά την αναζήτηση εξειδικευμένων γονιδιακών τόπων που τροποποιούν την πιθανότητα εκδήλωσης ΠΕΑ, οι επιστήμονες εστιάζουν στην επίδραση του γονιδίου στη δομή του αγγειακού τοιχώματος(155, 168, 235) ή την αλληλεπίδραση του γονιδίου με τις διαδικασίες θρόμβωσης(159). Επίσης, επιδημιολογικές και γενετικές μελέτες έδειξαν ότι στην παθογένεση της λοβώδους και μη-λοβώδους ICH επιδρούν διαφορετικοί μηχανισμοί(155). Ο πολυμορφισμός της απολιποπρωτεΐνης E επηρεάζει την εκδήλωση της λοβώδους ICH, ενώ ο DD γονότυπος του ACE πολυμορφισμού συνδέεται με την εμφάνιση ICH σε βαθύτερες εγκεφαλικές δομές(155, 168).

Ο A/T πολυμορφισμός στο πεπτιδίο σήματος της ACT έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε ποικίλα νοσήματα του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένης και της ΠΕΑ. Ο πολυμορφισμός αυτός επιλέχθηκε διότι φαίνεται να επηρεάζει την έκκριση της πρωτεΐνης(219) και τα επίπεδά της στο πλάσμα. Ωστόσο, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες και διερευνήθηκαν τα επίπεδα της ACT στο πλάσμα προέκυψαν αντιφατικά αποτελέσματα. Αυξημένα επίπεδα ACT στο πλάσμα συσχετίστηκαν είτε με το A(221) είτε με το T(179, 220) αλληλόμορφο, ενώ σε άλλες μελέτες(223) δεν προέκυψε καμία συσχέτιση. Τα αντιφατικά αυτά ευρήματα πιθανόν να είναι αποτέλεσμα άλλων παραγόντων, όπως για παράδειγμα της περιφερικής φλεγμονώδους αντίδρασης ή γενετικών παραγόντων(224), που επηρεάζουν τα επίπεδα της ACT και καλύπτουν τα αποτελέσματα του ACT πολυμορφισμού. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της ACT στο ENY ήταν υψηλότερη σε ACT-AA γονότυπο ασθενών με ατροφία πολλαπλών συστημάτων (MSA) σε σύγκριση με άλλους γονότυπους καθώς και τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου(213). Επίσης πρέπει να ειπωθεί ότι δεν υπάρχει καμία μελέτη που να ερευνά την επίδραση του πολυμορφισμού στην ανασταλτική ικανότητα του ενζύμου.

Η ρήξη του αρτηριακού τοιχώματος κατά την ΠΕΑ οδηγεί στην τοπική συσσώρευση αίματος το οποίο προκαλεί την έναρξη δευτεροπαθών γεγονότων, όπως δημιουργία οιδήματος στο σημείο της βλάβης, διείσδυση κυττάρων, παραγωγή πρωτεασών(187) και φλεγμονωδών μορίων(121). Η ACT είναι ένας αναστολέας πρωτεασών οξείας φάσης και εκκρίνεται από το ήπαρ για να περιορίσει την εκτεταμένη πρωτεολυτική βλάβη του φυσιολογικού ιστού(175). Επιπλέον, η ACT εκφράζεται στον εγκεφαλικό ιστό από τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα, μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και οξεία μηχανική βλάβη(409), αναστέλλοντας τη

δράση των πρωτεασών σερίνης που παράγονται στο σημείο της βλάβης(188). Επίσης, βρέθηκε ότι η IL-1 επάγει την υπέρ-έκφραση του mRNA της ACT στα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα(410). Η παραγωγή της ACT επάγεται αμέσως μετά από εγκεφαλική κάκωση και τα επίπεδά της παραμένουν ανιχνεύσιμα για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα(411). Ο ρόλος της ACT μετά από εγκεφαλική κάκωση δεν πλήρως έχει διευκρινιστεί. Πιθανόν να περιορίζει την επέκταση της φλεγμονώδους αντίδρασης, αναστέλλοντας τη δράση των πρωτεασών σερίνης που εκφράζονται στο πλάσμα ή τον εγκεφαλικό ιστό. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και η καθεψίνη G (cat G) που επηρεάζει την αναδιάρθρωση (remodeling) της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την διείσδυση των φλεγμονωδών κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής(409). Η χορήγηση ανασυνδυασμένης ACT (LEX032), που αναστέλλει τη δράση της ελαστάσης και της cat G, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η ACT επηρεάζει τη συναπτική αναδιάρθρωση και την επιβίωση των νευρωνικών πληθυσμών(181, 206, 207) και εμποδίζει τη δράση των ελεύθερων ριζών υπεροξειδίου, αλληλεπιδρώντας με την NADPH οξειδάση των ουδετερόφιλων(204). Ωστόσο, in vitro ευρήματα φανερώνουν ότι η ACT χάνει την αντί-φλεγμονώδη δράση της όταν σχηματίζει σύμπλοκα με πρωτεάσες και άλλα μόρια, όπως το Αβ πεπτιδίο και τα σύμπλοκα αυτά δρουν ως προ-φλεγμονώδη μόρια(201, 409). Επίσης, η ACT επάγει την παραγωγή IL-1 από τα αστροκύτταρα. Προς την κατεύθυνση αυτή σε μια πρόσφατη μελέτη(181) επισημάνθηκε η διπλή δράση της ACT (επιβλαβής ή προστατευτική) όταν αυτή παράγεται από τα αστροκύτταρα ή τους νευρώνες αντίστοιχα.

Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι η ένταση της φλεγμονώδους αντίδρασης σχετίζεται με την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης(412) και κατ' επέκταση με την κλινική εικόνα και την έκβαση του ασθενούς(413). Επιπλέον, διάφοροι γενετικοί παράγοντες έχουν βρεθεί ότι επηρεάζουν την κλινική έκβαση ασθενών με ΠΕΑ(156). Για το λόγο αυτό, η μελέτη μας σχεδιάστηκε να διερευνήσει, μεταξύ των άλλων, και την επίδραση του ACT πολυμορφισμού τόσο στη σοβαρότητα της κλινικής εικόνας του ασθενούς κατά την εισαγωγή όσο και στην εξάμηνη έκβασή του. Ωστόσο, από τη μελέτη μας δεν προέκυψε ότι ο A/T πολυμορφισμός της ACT, επηρεάζει την κλινική εικόνα του ασθενούς, τουλάχιστον σ' ένα μετρήσιμο κλινικό επίπεδο. Χρειάζεται βέβαια επιβεβαίωση του παραπάνω αποτελέσματος σε ανεξάρτητα πληθυσμιακά δείγματα. Θα ήταν επίσης ενδιαφέρον για μελλοντικές μελέτες να διερευνηθεί ο ρόλος του ACT πολυμορφισμού στην ένταση της φλεγμονώδους αντίδρασης και την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ποικίλες εγκεφαλικές κακώσεις σε πειραματικά μοντέλα ή σε παθολογοανατομικά παρασκευάσματα.

Οι υποκείμενες παθολογοανατομικές βλάβες της ΠΕΑ είναι οι υπερτασικές, εκφυλιστικές αλλοιώσεις των μικρών διαπιπραινόντων αρτηριών(414) και η αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια (CAA) κυρίως στα φλοιώδη αγγεία των λοβών του εγκεφάλου(415). Οι υπερτασικές βλάβες των αγγείων περιλαμβάνουν την λιποϋαλίνωση, τις μικροαθηρωματικές αλλοιώσεις και το σχηματισμό μικροανευρυσμάτων(414). Ποικίλοι παράγοντες εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του τοιχώματος των μικρών αγγείων(414). Οι πρωτεάσες και οι αναστολείς τους επηρεάζουν την αναδιάρθρωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και επιδρούν στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και των λείων μυϊκών ινών(416).

Η καθεψίνη G (cat G) παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων, καθώς καταλύει το σχηματισμό της αγγειοτενσίνης II εντός του τοιχώματος των αγγείων(192). Είναι γνωστό ότι η αγγειοτενσίνη II επάγει την αθηρογένεση, μέσω ποικίλων μηχανισμών(417). Επίσης βρέθηκε ότι η cat G προκαλεί βλάβες στο ενδοθήλιο του σπειράματος των νεφρών(418). Επιπλέον, συμμετέχει στη συσσώρευση και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καθώς και στη διάσπαση των παραγόντων πήξης και των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας(193). Όλες αυτές οι δράσεις της cat G πιθανόν να καθιστούν το αγγειακό τοίχωμα πιο εύθραυστο και επιρρεπές σε αιμορραγικά γεγονότα(238).

Η ACT αποτελεί συστατικό του αγγειακού τοιχώματος είτε διότι παράγεται τοπικά(197) είτε διότι απορροφάται από το πλάσμα(195). Πιο συγκεκριμένα, η ACT συνδέεται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου, μέσω ενός εξειδικευμένου υποδοχέα, και προστατεύει το αγγειακό δίκτυο από την επιβλαβή δράση της cat G των ουδετερόφιλων(195). Χορήγηση ανασυνδυασμένης ACT σε πειραματικά μοντέλα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ισχαιμικής βλάβης και της συσσώρευσης των ουδετερόφιλων, καθώς και τη διατήρηση της λειτουργικότητας του ενδοθηλίου(419). Επίσης μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ACT παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των λείων μυϊκών ινών και στη διατήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας(420). Το T αλληλόμορφο του ACT πολυμορφισμού βρέθηκε ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ανευρυσματικής υπαραχνοειδούς αιμορραγίας. Η συσχέτιση αυτή αποδόθηκε στην επίδραση της ACT στην αναδιάρθρωση του τοιχώματος των αγγείων και στις φλεγμονώδεις διεργασίες, τα οποία διέπουν το σχηματισμό ανευρυσμάτων(238).

Μια άλλη αιτία για την εκδήλωση ICH είναι η CAA. Το κύριο συστατικό της CAA είναι το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς (Aβ), που επάγει δευτερογενείς παθολογικές αλλοιώσεις στο αγγειακό τοίχωμα, φλεγμονώδη αντίδραση και τελικά ρήξη του αγγείου(415). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ACT εμπλέκεται στην παθογένεση της CAA. Είναι γνωστό ότι η ACT αλληλεπιδρά in vitro με το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς (Aβ) και επάγει τον πολυμερισμό του σε ινίδια αμυλοειδούς(196).

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν την αμυλοειδογόνο δράση της ACT τόσο σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου(197) όσο και στα εγκεφαλικά αγγεία(189). Σε μια μελέτη συσχέτισης, στην οποία διερευνήθηκε το αποτέλεσμα του ACT πολυμορφισμού στη CAA, βρέθηκε υψηλή συχνότητα του T αλληλομόρφου σε ασθενείς με CAA(230), ενώ σ' άλλη μελέτη το A αλληλόμορφο σχετίστηκε με τη σοβαρότητα της CAA, σε ασθενείς με AD(229).

Στην αρχική μελέτη του Obach και συν.(235) βρέθηκε ότι ο A/T πολυμορφισμός του πεπτιδίου σήματος της ACT σχετίζεται με την πιθανότητα εμφάνισης ΠΕΑ. Συγκεκριμένα, ο ACT πολυμορφισμός μελετήθηκε σε 99 ασθενείς με αιμορραγικό ΑΕΕ, από τους οποίους οι 33 δεν είχαν ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης. Ο TT γονότυπος βρέθηκε να έχει μια τάση αυξημένης συχνότητας στους ασθενείς με ΠΕΑ σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (OR=1.79, 95% CI 0.95-3.40). Η συσχέτιση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική στους ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα αρτηριακής πίεσης (OR=2.53 95% CI 1.04-6.18). Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι η ACT εμπλέκεται στην αγγειακή βλάβη και στην παθογένεση της CAA(235). Στην ίδια μελέτη φαίνεται ότι η ομάδα των ασθενών με EA διαφέρει σημαντικά ως προς τους γονότυπους της ACT από μια ομάδα 182 ασθενών με ισχαιμικό ΑΕΕ. (OR=2.80, 95% CI 1.19-6.58 στο σύνολο των δύο ομάδων και OR=3.10 95% CI 1.10-8.68 όταν συγκρίνονται οι μη υπερτασικοί ασθενείς).

Μια επιπλέον μελέτη του ρόλου της ACT στην παθογένεση της ΠΕΑ σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών (n=220) και φυσιολογικών μαρτύρων (n=272) από την Κίνα(237) επιβεβαιώθηκε το παραπάνω αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα οι γονότυποι AT και TT σχετιζόταν με μεγαλύτερο κίνδυνο ΠΕΑ κατά OR = 2.33 και 2.17 αντίστοιχα, $p < 0.05$. Ωστόσο, η συσχέτιση ήταν πιο σημαντική στην ομάδα των ασθενών με αρτηριακή υπέρταση που έρχεται σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη.

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μια παρόμοια μελέτη σε 95 ασθενείς και 190 φυσιολογικούς μάρτυρες από την Πολωνία(173). Στη μελέτη αυτή δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών μαρτύρων.

Στη δικιά μας μελέτη γονότυπος TT στο υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης EA στους ασθενείς χωρίς αρτηριακή πίεση OR (95% confidence intervals)=2.57 (1.02-6.51) $p=0.05$. Στο μοντέλο επικρατητικής κληρονόμησης υπάρχει μια τάση για συσχέτιση του γονότυπου TT (OR (95% C.I.)= 0.61 (0.35-1.07), $p=0.08$). Όταν εξετάσαμε για την επίδραση του αριθμού των αλληλομόρφων T για την πρόκληση EA φάνηκε ότι η παρουσία ενός αλληλομόρφου T σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης EA στο σύνολο των ασθενών με EA.

Στις ασθένειες πολλαπλής αιτιολογίας, όπως η ΠΕΑ, η ταυτοποίηση των γονιδίων ευαισθησίας με μελέτες συσχέτισης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Έτσι, η αναπαραγωγή των θετικών αποτελεσμάτων σε ανεξάρτητα δείγματα αποτελεί ένα αξιόπιστο στοιχείο για την επιβεβαίωση των θετικών συσχετίσεων και των αποκλεισμό των μη-αντιπροσωπευτικών δειγμάτων(421).

Η μελέτη μας φαίνεται ότι αναπαράγει τα θετικά αποτελέσματα στους μη υπερτασικούς ασθενείς που παρατηρήθηκαν αρχικά στους ασθενείς από την Ισπανία(235). Ωστόσο, πρέπει να τονίσουμε ότι η συσχέτιση είναι οριακή ($p=0.05$) ειδικά σε αυτού του τύπου τις μελέτες όπου πολλαπλές συσχετίσεις αναζητούνται (Bonferroni correction). Επιπλέον, θα πρέπει να ειπωθεί ότι όταν εξετάσθηκε η επίδραση των αλληλομόρφων, το T αλληλόμορφο βρέθηκε να ασκεί προστατευτική δράση, που έρχεται σε αντίθεση με το προηγούμενο αποτέλεσμα και η οποία δεν υφίστατο όταν εξεταζόταν τα δύο T αλληλόμορφα (gene dose effect).

Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι οι μη-υπερτασικοί ασθενείς, στους οποίους βρέθηκε μεγαλύτερη επίδραση του ACT πολυμορφισμού, αποτελούν μια ετερογενή ομάδα, η οποία περιλαμβάνει ασθενείς με λοβώδη και μη-λοβώδη αιμορραγία που όπως αναφέρθηκε προηγούμενα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές παθολογίες. Ωστόσο, στους μη-υπερτασικούς ασθενείς, η απουσία υπέρτασης, που αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση ΠΕΑ, πιθανόν να καθιστά φανερή την επίδραση του ACT πολυμορφισμού στο αγγειακό δίκτυο του εγκεφάλου. Η μικρή αυτή επίδραση του ACT πολυμορφισμού(221) φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη σχετικά μικρή στατιστική σημαντικότητα, καθώς και για τα αντιφατικά αποτελέσματα των μελετών συσχέτισης που διερευνούν τον πολυμορφισμό αυτό σε άλλα νοσήματα του ΚΝΣ(235).

Θα πρέπει να γίνει κατανοητό ότι πολλές, διαφορετικές, γονιδιακές περιοχές μπορούν να συνεισφέρουν στην αγγειακή βλάβη και την παθογένεση της ΠΕΑ, όπου το κάθε ανεξάρτητο γονίδιο επιδρά σε έναν σχετικά μικρό βαθμό. Περαιτέρω μελέτες, ιδιαίτερα σε πειραματικά μοντέλα, απαιτούνται για τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου του ACT πολυμορφισμού στην παθοφυσιολογία της ΙCH.

Πολυμορφισμός του ACE

Υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον των επιστημόνων στην αναγνώριση διαφόρων γενετικών παραγόντων κινδύνου για την εκδήλωση της ΠΕΑ και των υποομάδων της (λοβώδης, μη-λοβώδης). Σε μια επιδημιολογική μελέτη(422) παρατηρήθηκε οικογενής συσσώρευση των ασθενών με ΠΕΑ ιδιαίτερα όταν η αιμορραγία εντοπιζόταν στις εν τω βάθει δομές του εγκεφάλου. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι 14

από 144 προοπτικά συλλεχθέντες ασθενείς με ΠΕΑ είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό ΕΑ (ποσοστό 9.8%). Από αυτούς, 9 ασθενείς από ένα σύνολο 75 ασθενών (ποσοστό 12%) είχαν εντόπιση της αιμορραγίας σε περιοχές των βασικών γαγγλίων και του θαλάμου ήταν δηλαδή τυπικές υπερτασικής ΕΑ. Η οικογενής συσσώρευση των περιστατικών ΠΕΑ φανερώνει ότι στην παθοφυσιολογία της ΕΑ συμμετέχουν πλην των γνωστών παραγόντων κινδύνου και διάφοροι γενετικοί παράγοντες οι οποίοι διαμέσου ποικίλων μηχανισμών μπορούν να επηρεάζουν για παράδειγμα τη σταθερότητα του αγγειακού τοιχώματος ή να εμπλέκονται στους μηχανισμούς πήξης.

Ο πολυμορφισμός του ACE γονιδίου επιλέχθηκε διότι το ACE εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της βλάβης του αγγειακού τοιχώματος. Αυτή η επίδραση του ACE στην αναδιάρθρωση (remodeling) του αγγειακού τοιχώματος φαίνεται χαρακτηριστικά σε μια μελέτη σε πειραματικά μοντέλα αρουραίων στα οποία η in vivo μεταφορά του ACE γονιδίου σε φυσιολογική καρωτίδα προκάλεσε την ανάπτυξη αγγειακής υπερτροφίας, ανεξάρτητα από την παρουσία συστηματικών παραγόντων και αιμοδυναμικών επιδράσεων(423). Επιπρόσθετα, η επιλεκτική υπερέκφραση του ACE στην καρδιά προκάλεσε μορφολογικές αλλοιώσεις στις καρδιακές κοιλότητες, αρρυθμίες, καθώς και αιφνίδιο θάνατο(424). Επίσης, σε μια μελέτη διαγονιδιακών ποντικών για το γονίδιο της προ-ρενίνης (με αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης), με φυσιολογικά όμως επίπεδα αρτηριακής πίεσης, βρέθηκε ότι, παρά την απουσία αρτηριακής υπέρτασης, ανέπτυξαν τυπικές υπερτασικές αγγειακές βλάβες, συμπεριλαμβανομένης και της ινοειδούς νέκρωσης(425).

Η σημασία αυτών των μελετών είναι ότι βοηθούν στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της βλάβης του αγγειακού τοιχώματος για την οποία πρέπει να υπάρξει αποσύνδεση των γενετικών παραγόντων από τις επιπτώσεις της αυξημένης αρτηριακής πίεσης και των λοιπών παραγόντων κινδύνου. Σ' όλες αυτές τις μελέτες η βλάβη προκαλείται από τοπική παραγωγή, με τη μεσολάβηση του ACE, της Ang II, που αποτελεί ισχυρό συσταλτικό παράγοντα των αγγείων, και επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη και την εναπόθεση της θεμέλιας ουσίας, συμβάλλοντας στην αναδιάρθρωση (remodeling) του αγγειακού τοιχώματος. Ένα επίσης ενδιαφέρον εύρημα με θεραπευτικές προεκτάσεις είναι ότι η κακοήθης αγγειακή βλάβη σε διαγονιδιακά μοντέλα κακοήθους υπέρτασης με υπερέκφραση του ACE γονιδίου(426) μπορεί να αποτραπεί με αναστολή της δράσης του ACE ενζύμου, μέσω φαρμακευτικών ουσιών(427).

Επίσης θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ACE ένζυμο πιθανόν να εμπλέκεται και σε βλάβη του αγγειακού τοιχώματος οφειλόμενη σε αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια. Βρέθηκε ότι το ACE ένζυμο διασπά το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς in vitro(252), με

αποτέλεσμα τα υψηλά επίπεδα του ACE ενζύμου που παρατηρούνται στους DD ομοζυγώτες πιθανόν να παίζουν προστατευτικό ρόλο στην AD και την CAA. Ήδη σε πολλές μελέτες έχουν βρεθεί θετική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία του I αλληλομόρφου και την εκδήλωση της AD(271). Για το λόγο αυτό θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί ο I/D πολυμορφισμός της ACE σε παθολογοανατομικά επιβεβαιωμένη CAA.

Ο I/D πολυμορφισμός του ACE γονιδίου έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε ποικίλα νοσήματα. Έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση αθηροσκλήρυνσης και εμφράγματος του μυοκαρδίου(268). Ο πολυμορφισμός αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός σε κλινικό επίπεδο, καθώς επηρεάζει τα επίπεδα του ACE ενζύμου στο πλάσμα(258) και τους ιστούς(259, 260).

Σε μια πρόσφατη μελέτη(168) σε 58 ασθενείς από την Πολωνία με ΠΕΑ μη-λοβώδους εντόπισης βρέθηκε ότι ο DD γονότυπος και το αλληλόμορφο D του ACE γονιδίου ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για ΠΕΑ ((OR=2.13, 95% CI 1.10 με 4.14, $p=0.02$ και OR=1.62, 95% CI 1.02 με 2.56, $p=0.04$ αντίστοιχα). Όταν όμως εξαιρέθηκαν από την μελέτη οι ασθενείς που ελάμβαναν αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου (ACE inhibitors) η συσχέτιση παρέμεινε σημαντική μόνο για τον DD γονότυπο(OR=2.07, 95% CI 1.00-4.28, και $p=0.048$). στο μοντέλο όμως της λογιστικής παλινδρόμησης το αποτέλεσμα αυτό δε διατηρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

Υπάρχει επίσης μία παλαιότερη μικρότερη μελέτη(167) σε 48 ασθενείς με ΠΕΑ χωρίς να διευκρινίζεται η εντόπιση της αιμορραγίας, στην οποία δε βρέθηκε συσχέτιση με τον ACE πολυμορφισμό.

Στη μελέτη μας δεν ανιχνεύτηκε καμιά συσχέτιση καθώς η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων του I/D πολυμορφισμού ήταν παρόμοια ανάμεσα στη φυσιολογική ομάδα ελέγχου και τους ασθενείς με ΠΕΑ καθώς και στις υποομάδες των ασθενών.

Οι διαφορές που παρατηρούνται στις μελέτες αυτές πιθανόν να είναι συνέπεια ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων αντίστοιχα. Επιπλέον, η ΠΕΑ πιθανόν να οφείλεται στην αλληλεπίδραση ποικίλων γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι κάθε φορά συμμετέχουν σε διαφορετικό βαθμό και συνεισφέρουν στη φαινοτυπική ετερογένεια που παρατηρείται μεταξύ των πληθυσμών.

Επιπλέον, ο I/D πολυμορφισμός του ACE γονιδίου μερικώς καθορίζει τα επίπεδα του ACE στο πλάσμα. Οι DD ομοζυγώτες έχουν περίπου τη διπλάσια μέση συγκέντρωση του ACE σε σχέση με τους II ομοζυγώτες, αλλά ο πολυμορφισμός αυτός είναι υπεύθυνος για το μόνο για 50% της παρατηρούμενης διακύμανσης στα

επίπεδα του ACE ενζύμου στο πλάσμα(258). Παρά τις εκτεταμένες έρευνες, η ακριβής θέση του λειτουργικού πολυμορφισμού στο ACE γονίδιο δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Το γεγονός ότι ο ACE I/D πολυμορφισμός πιθανόν να μην είναι ο λειτουργικός πολυμορφισμός θα μπορούσε να εξηγήσει τα αντιφατικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τις δύο μελέτες.

Στη μελέτη μας διερευνήθηκε επίσης η επίδραση του ACE πολυμορφισμού στην κλινική εικόνα των ασθενών κατά την εισαγωγή καθώς και στην εξάμηνη έκβασή τους. Το ACE ένζυμο φαίνεται να επηρεάζει μέσω του σχηματισμού της Ang II το βαθμό φλεγμονής του εγκεφαλικού παρεγχύματος μετά από ICH, την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου και την απόπτωση των νευρικών κυττάρων. Ωστόσο, στην μελέτη μας δεν βρέθηκε συσχέτιση του I/D πολυμορφισμού με την κλινική εικόνα των ασθενών με ΠΕΑ.

Ένα πιθανό μειονέκτημα της μελέτης μας είναι ότι δε διενεργήθηκε σε όλους τους υπερτασικούς ασθενείς αγγειογραφία όπως στη έγινε στη μελέτη της Slowik και συν.(168) για αποκλεισμό αγγειακής δυσπλασίας. Αυτό όμως δεν ήταν εφικτό για όλους τους υπερτασικούς ασθενείς της μελέτη μας, λόγω της πρώιμης θνησιμότητας καθώς και βαριάς κλινικής εικόνας ορισμένων εξ αυτών. Σε εξαίρεση αυτών των ασθενών, το δείγμα μας δε θα ήταν πλέον αντιπροσωπευτικό (biased). Επιπρόσθετα, σε μια προοπτική μελέτη συμβατικής αγγειογραφίας(85) σε ασθενείς που έπασχαν από ΠΕΑ δε βρέθηκαν αγγειακές βλάβες σε υπερτασικούς ασθενείς, ηλικίας μεγαλύτερης των 45 ετών και με μη-λοβώδης ΠΕΑ . Για το λόγο αυτό, οι συγγραφείς δε συνέστησαν τη χρήση αγγειογραφίας σε τέτοιες περιπτώσεις(3, 85).

Συμπερασματικά δεν προέκυψαν στοιχεία επίδρασης του I/D πολυμορφισμού του ACE στους ασθενείς μας με ΠΕΑ. Οποσδήποτε χρειάζεται έλεγχος του πολυμορφισμού αυτού σε μεγαλύτερα δείγματα και διαφορετικές εθνικότητες για να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα.

Πολυμορφισμοί των ιντερλευκινών (IL-1a (-889), IL-1b(-511), IL-1Ra)

Μια σειρά πολύπλοκων δευτεροπαθών αλλοιώσεων επάγονται αμέσως μετά την ΠΕΑ και περιλαμβάνουν τη διάσπαση του αιμοτοεγκεφαλικού φραγμού, τη δημιουργία οιδήματος, την μειωμένη αιμάτωση, την απελευθέρωση κυτταροτοξικών ουσιών (όπως ιόντα Ca^{2+} και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) και την παραγωγή διάφορων επιβλαβών πρωτεϊνών. Τελευταία, όλο και περισσότερο γίνεται φανερό ότι η φλεγμονώδης αντίδραση διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από αιμορραγία. Αυτή περιλαμβάνει τη διήθηση στη βλάβη περιφερικών ανοσοποιητικών κυττάρων, την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών

εγκεφαλικών κυττάρων (αστροκύτταρα, μικρογλοία) και την παραγωγή διαφόρων νευροτοξικών αλλά και νευροτροφικών ιντερλευκινών.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον για τον ρόλο των ιντερλευκινών και της φλεγμονής γενικότερα στις ΠΕΑ. Τα συμπεράσματα εξάγονται κυρίως μετά από μελέτες σε πειραματόζωα (συμπεριλαμβανομένων και διαγονιδιακών πειραματόζωων) με τη μέτρηση των ιντερλευκινών στον εγκέφαλο μετά από ΠΕΑ, αλλά και την παρακολούθηση της φλεγμονώδους απάντησης μετά την τοπική χορήγηση της υπό έρευνα ιντερλευκίνης ή του αναστολέα της στον εγκεφαλικό ιστό. Επιπλέον, σε ασθενείς με ΠΕΑ έχουν πραγματοποιηθεί μετρήσεις των ιντερλευκινών στον ορό, στο ΕΝΥ ή και στον εγκεφαλικό ιστό όπου αυτό ήταν δυνατό. Η μελέτη τέλος των πολυμορφισμών των ιντερλευκινών είναι ένας έμμεσος τρόπος διερεύνησης του ρόλου των ιντερλευκινών στους ανθρώπους καθότι υπάρχει διαφορά στην έκφραση των γονιδίων στους διάφορους γονότυπους με αποτέλεσμα διαφορετικό βαθμό φλεγμονώδους απάντησης στο ίδιο ερέθισμα.

Η έκφραση της IL-1 και της IL-1ra στον εγκεφαλικό ιστό αυξάνεται μετά από εγκεφαλική αιμορραγία(335) αν και με μια καθυστέρηση συγκριτικά με τις άλλες εγκεφαλικές κακώσεις(337). Η χορήγηση IL-1 σε πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν εγκεφαλική κάκωση επιδεινώνει δραματικά την εγκεφαλική βλάβη(339) με τη μεσολάβηση πολύπλοκων μηχανισμών όπως συσσώρευση ουδετερόφιλων, έκφραση φλεγμονωδών πρωτεϊνών, ενεργοποίηση της γλοίας και του συμπληρώματος και την απελευθέρωση διάφορων οξειδωτικών μορίων. Σε πολλές περιπτώσεις τα αυξημένα επίπεδα της IL-1 σχετίζονται με την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης και την κλινική έκβαση των ασθενών(338).

Για τη μελέτη μας επιλέξαμε δύο λειτουργικούς πολυμορφισμούς της IL-1, στο γονίδιο της IL-1β, στη θέση του υποκινητή (-511)(302) και στο γονίδιο της IL-1α, στη θέση του υποκινητή (-889), που επηρεάζουν την έκφραση της IL-1β και της IL-1α αντίστοιχα. Συγκεκριμένα το αλληλόμορφο 2 του πολυμορφισμού της IL-1β (-511 C/T) σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή IL-1β σε σχέση με το αντίστοιχό του 1 αλληλόμορφο(303, 304), ενώ το αλληλόμορφο 2 της IL-1α (-889 C/T) επίσης αντιπροσωπεύει ένα φαινότυπο υπερέκκρισης της IL-1(323, 324). Τα άτομα που φέρουν αυτά τα αλληλόμορφα είναι επιρρεπή στο να παρουσιάσουν αυξημένη φλεγμονώδη απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη συσχέτιση των παραπάνω πολυμορφισμών με ποικίλα νοσήματα του ΚΝΣ, τα οποία εμπλέκουν φλεγμονώδεις μηχανισμούς(318, 319, 330, 333).

Παρ' όλα αυτά στη μελέτη μας δε βρέθηκε συσχέτιση των πολυμορφισμών αυτών με την κλινική εικόνα (GCS) και την έκβαση (mRS) των ασθενών με ΠΕΑ. Είναι πιθανόν ότι η συμμετοχή των πολυμορφισμών αυτών στην φλεγμονώδη

αντίδραση μετά από ΠΕΑ δεν είναι τόσο σημαντική ώστε να επηρεάζει τις παραπάνω κλινικές παραμέτρους των ασθενών.

Η IL-1ra (interleukin 1 receptor antagonist) είναι το τρίτο μέλος της οικογένειας της IL-1 και είναι ο ανταγωνιστής των υποδοχέων της IL-1α και της IL-1β. Η IL-1ra αναστέλλει τη δράση της IL-1α και της IL-1β και μειώνει την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΠΕΑ μέσω μείωσης της φλεγμονής, αναστολής ενεργοποίησης της γλοίας, ελάττωσης του οιδήματος και της απώλειας των νευρικών κυττάρων(347). Πειράματα επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητά της ακόμα και σε περιφερική χορήγηση μετά από εγκεφαλική κάκωση(347). Ένας πολυμορφισμός VNTR στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου της IL-1ra(400) έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων IL-1β και IL-1ra. Οι φορείς του αλληλομόρφου 2 παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση IL-1β και δύο με τρεις φορές χαμηλότερη παραγωγή IL-1ra, συνεπώς αντιπροσωπεύουν έναν προ-φλεγμονώδη φαινότυπο(397). Έχει δημοσιευτεί μια πληθώρα μελετών συσχέτισης του αλληλομόρφου 2 με ποικιλία φλεγμονωδών νοσημάτων(397).

Όμως, στη μελέτη μας δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του VNTR της IL-1ra με την κλινική εικόνα κατά την εισαγωγή και έκβαση των ασθενών με ΠΕΑ.

Η IL-1 εμπλέκεται στην βλάβη του αγγειακού τοιχώματος και συμβάλλει στην αθηρωμάτωση των αγγείων. Συγκεκριμένα, η IL-1 προκαλεί ποικίλες φλεγμονώδεις αντιδράσεις στο αγγειακό τοίχωμα όπως είναι η επαγωγή των μορίων προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων(370), διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών(372) και την έκκριση διαφόρων άλλων κυτταροκινών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τις λείες μυϊκές ίνες(370). Αντιθέτως, η IL-1ra που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τις λείες μυϊκές ίνες, αναστέλλει τις αθηρωματικές επιδράσεις της IL-1 στα κύτταρα των αγγείων (374). Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η ανασυνδασμένη IL-1ra αναστέλλει αποτελεσματικά τη δημιουργία αθηρωματικών αλλοιώσεων σε apoE^{-/-} ποντίκια(375). Σε knockout ποντίκια για το γονίδιο της IL-1ra έχει περιγραφεί αυτόματη αρτηριακή φλεγμονή και ανευρυσματική αιμορραγία(381) σε σημεία αυξημένης πίεσης και στροβιλώδους ροής του αίματος. Αυτή η αυτόματη αρτηριακή βλάβη στα ποντίκια που στερούνταν την IL-1ra αποδόθηκε στα επιβλαβή αποτελέσματα της τοπικής δράσης της IL-1, η οποία επάγεται από τη μηχανική βλάβη στο ενδοθήλιο. Είναι γνωστό ότι η IL-1ra είναι σημαντική στην αντιμετώπιση των επιβλαβών αποτελεσμάτων της IL-1.

Επιπλέον της δράσης της στο αγγειακό τοίχωμα, η IL-1 επιλέχθηκε για την μελέτη σε ασθενείς με ΠΕΑ επειδή εμπλέκεται στους μηχανισμούς της πήξης.

Συγκεκριμένα, η IL-1 έχει θρομβωτικές ιδιότητες επειδή επάγει(383) την παραγωγή και έκφραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μονοκύτταρα του ιστικού παράγοντα με αποτέλεσμα την ταχεία έναρξη του πηκτικού μηχανισμού ενδαγγειακά ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει το αντιθρομβωτικό μονοπάτι της πρωτεΐνης C(382).

Σε μια πρόσφατη μελέτη μας ανακοινώθηκε ότι το αλληλόμορφο 2 της IL-1ra (VNTR) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αιμορραγικών φαινομένων σε άτομα με κρανιοεγκεφαλική κάκωση, συσχέτιση που αποδόθηκε στο ρόλο των ιντερλευκινών στην ομοίωση του αγγειακού τοιχώματος και στην εμπλοκή τους στους μηχανισμούς πήξης(404).

Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη η κατανομή των αλληλομόρφων και των γονοτύπων των μελετηθέντων ιντερλευκινών δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά ανάμεσα στους φυσιολογικούς μάρτυρες και τους ασθενείς με ΠΕΑ και τις διάφορες υποομάδες τους.

Είναι γνωστό ότι οι ιντερλευκίνες δρουν σε ένα πολύ περιορισμένο μικροπεριβάλλον, ενώ έχουν πολλαπλές λειτουργίες και στόχους και συχνά επικαλυπτόμενα βιολογικά αποτελέσματα. Είναι δύσκολο να συμπεράνουμε χωρίς να διαθέτουμε δείγματα ιστών από την προσβεβλημένη περιοχή. Επιπλέον μελέτες απαιτούνται για την διερεύνηση του ρόλου τους στην ΠΕΑ και των υποκείμενων παθογενετικών μηχανισμών.

Συμπερασματικά, δεν προέκυψαν στοιχεία επίδρασης των πολυμορφισμών των ιντερλευκινών στους ασθενείς μας με ΠΕΑ. Οποσδήποτε χρειάζεται έλεγχος του πολυμορφισμού αυτού σε μεγαλύτερα δείγματα και διαφορετικές εθνικότητες για να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα.

Βιβλιογραφία

1. Mayer SA, Rincon F. Treatment of intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol* 2005;4:662-672.
2. Foulkes MA, Wolf PA, Price TR, Mohr JP, Hier DB. The Stroke Data Bank: design, methods, and baseline characteristics. *Stroke* 1988;19:547-554.
3. Qureshi AI, Tuhrim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2001;344:1450-1460.
4. Passero S, Ulivelli M, Reale F. Primary intraventricular haemorrhage in adults. *Acta Neurol Scand* 2002;105:115-119.
5. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med* 1992;326:733-736.
6. Suzuki K, Kutsuzawa T, Takita K, et al. Clinico-epidemiologic study of stroke in Akita, Japan. *Stroke* 1987;18:402-406.
7. Qureshi AI, Giles WH, Croft JB. Racial differences in the incidence of intracerebral hemorrhage: effects of blood pressure and education. *Neurology* 1999;52:1617-1621.
8. Giroud M, Gras P, Chadan N, et al. Cerebral haemorrhage in a French prospective population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:595-598.
9. Gallerani M, Trappella G, Manfredini R, Pasin M, Napolitano M, Migliore A. Acute intracerebral haemorrhage: circadian and circannual patterns of onset. *Acta Neurol Scand* 1994;89:280-286.
10. Fisher CM. Pathological observations in hypertensive cerebral hemorrhage. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971;30:536-550.
11. Vinters HV. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke* 1987;18:311-324.
12. Jane JA, Kassell NF, Torner JC, Winn HR. The natural history of aneurysms and arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 1985;62:321-323.
13. Arteriovenous malformations of the brain in adults. *N Engl J Med* 1999;340:1812-1818.
14. Iwama T, Ohkuma A, Miwa Y, et al. Brain tumors manifesting as intracranial hemorrhage. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1992;32:130-135.
15. Niizuma H, Suzuki J, Yonemitsu T, Otsuki T. Spontaneous intracerebral hemorrhage and liver dysfunction. *Stroke* 1988;19:852-856.
16. Hart RG, Boop BS, Anderson DC. Oral anticoagulants and intracranial hemorrhage. Facts and hypotheses. *Stroke* 1995;26:1471-1477.
17. Hacke W, Brott T, Caplan L, et al. Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience. *Neurology* 1999;53:S3-14.
18. He J, Whelton PK, Vu B, Klag MJ. Aspirin and risk of hemorrhagic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama* 1998;280:1930-1935.
19. Suzuki J, Kodama N. Moyamoya disease--a review. *Stroke* 1983;14:104-109.
20. Barinagarrementeria F, Mendez A, Vega F. [Cerebral hemorrhage associated with the use phenylpropanolamine]. *Neurologia* 1990;5:292-295.
21. Ruiz-Sandoval JL, Cantu C, Barinagarrementeria F. Intracerebral hemorrhage in young people: analysis of risk factors, location, causes, and prognosis. *Stroke* 1999;30:537-541.
22. Matthews MK, Jr. Association of Ginkgo biloba with intracerebral hemorrhage. *Neurology* 1998;50:1933-1934.
23. McEvoy AW, Kitchen ND, Thomas DG. Intracerebral haemorrhage caused by drug abuse. *Lancet* 1998;351:1029.
24. Maymon R, Fejgin M. Intracranial hemorrhage during pregnancy and puerperium. *Obstet Gynecol Surv* 1990;45:157-159.
25. Brott T, Thalinger K, Hertzberg V. Hypertension as a risk factor for spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1986;17:1078-1083.
26. Thrift AG, McNeil JJ, Forbes A, Donnan GA. Three important subgroups of hypertensive persons at greater risk of intracerebral hemorrhage. Melbourne Risk Factor Study Group. *Hypertension* 1998;31:1223-1229.
27. Arakawa S, Saku Y, Ibayashi S, Nagao T, Fujishima M. Blood pressure control and recurrence of hypertensive brain hemorrhage. *Stroke* 1998;29:1806-1809.
28. Furlan AJ, Whisnant JP, Elveback LR. The decreasing incidence of primary intracerebral hemorrhage: a population study. *Ann Neurol* 1979;5:367-373.

29. Brott T, Broderick J, Kothari R, et al. Early hemorrhage growth in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1997;28:1-5.
30. Greenberg SM, Eng JA, Ning M, Smith EE, Rosand J. Hemorrhage burden predicts recurrent intracerebral hemorrhage after lobar hemorrhage. *Stroke* 2004;35:1415-1420.
31. O'Donnell HC, Rosand J, Knudsen KA, et al. Apolipoprotein E genotype and the risk of recurrent lobar intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2000;342:240-245.
32. Gill JS, Shipley MJ, Tsementzis SA, et al. Alcohol consumption--a risk factor for hemorrhagic and non-hemorrhagic stroke. *Am J Med* 1991;90:489-497.
33. Thrift AG, Donnan GA, McNeil JJ. Heavy drinking, but not moderate or intermediate drinking, increases the risk of intracerebral hemorrhage. *Epidemiology* 1999;10:307-312.
34. Segal AZ, Chiu RI, Eggleston-Sexton PM, Beiser A, Greenberg SM. Low cholesterol as a risk factor for primary intracerebral hemorrhage: A case-control study. *Neuroepidemiology* 1999;18:185-193.
35. Iso H, Jacobs DR, Jr., Wentworth D, Neaton JD, Cohen JD. Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *N Engl J Med* 1989;320:904-910.
36. Thrift AG, McNeil JJ, Forbes A, Donnan GA. Risk factors for cerebral hemorrhage in the era of well-controlled hypertension. Melbourne Risk Factor Study (MERFS) Group. *Stroke* 1996;27:2020-2025.
37. Saloheimo P, Juvela S, Hillbom M. Use of aspirin, epistaxis, and untreated hypertension as risk factors for primary intracerebral hemorrhage in middle-aged and elderly people. *Stroke* 2001;32:399-404.
38. Karibe H, Niizuma H, Ohyama H, Shirane R, Yoshimoto T. Hepatitis C virus (HCV) infection as a risk factor for spontaneous intracerebral hemorrhage: hospital based case-control study. *J Clin Neurosci* 2001;8:423-425.
39. Juvela S. Prevalence of risk factors in spontaneous intracerebral hemorrhage and aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Arch Neurol* 1996;53:734-740.
40. Mohr JP, Caplan LR, Melski JW, et al. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. *Neurology* 1978;28:754-762.
41. Andrews BT, Chiles BW, 3rd, Olsen WL, Pitts LH. The effect of intracerebral hematoma location on the risk of brain-stem compression and on clinical outcome. *J Neurosurg* 1988;69:518-522.
42. Melo TP, Pinto AN, Ferro JM. Headache in intracerebral hematomas. *Neurology* 1996;47:494-500.
43. Bladin CF, Alexandrov AV, Bellavance A, et al. Seizures after stroke: a prospective multicenter study. *Arch Neurol* 2000;57:1617-1622.
44. Tanaka A, Yoshinaga S, Nakayama Y, Kimura M, Tomonaga M. Cerebral blood flow and clinical outcome in patients with thalamic hemorrhages: a comparison with putaminal hemorrhages. *J Neurol Sci* 1996;144:191-197.
45. Ott KH, Kase CS, Ojemann RG, Mohr JP. Cerebellar hemorrhage: diagnosis and treatment. A review of 56 cases. *Arch Neurol* 1974;31:160-167.
46. Hier DB, Davis KR, Richardson EP, Jr., Mohr JP. Hypertensive putaminal hemorrhage. *Ann Neurol* 1977;1:152-159.
47. Chung CS, Caplan LR, Han W, Pessin MS, Lee KH, Kim JM. Thalamic haemorrhage. *Brain* 1996;119 (Pt 6):1873-1886.
48. Goto N, Kaneko M, Hosaka Y, Koga H. Primary pontine hemorrhage: clinicopathological correlations. *Stroke* 1980;11:84-90.
49. Kushner MJ, Bressman SB. The clinical manifestations of pontine hemorrhage. *Neurology* 1985;35:637-643.
50. Brennan RW, Bergland RM. Acute cerebellar hemorrhage. Analysis of clinical findings and outcome in 12 cases. *Neurology* 1977;27:527-532.
51. Heiman TD, Satya-Murti S. Benign cerebellar hemorrhages. *Ann Neurol* 1978;3:366-368.
52. Ropper AH, Davis KR. Lobar cerebral hemorrhages: acute clinical syndromes in 26 cases. *Ann Neurol* 1980;8:141-147.
53. Stein RW, Kase CS, Hier DB, et al. Caudate hemorrhage. *Neurology* 1984;34:1549-1554.
54. Weisberg LA. Mesencephalic hemorrhages: clinical and computed tomographic correlations. *Neurology* 1986;36:713-716.

55. Barinagarrementeria F, Cantu C. Primary medullary hemorrhage. Report of four cases and review of the literature. *Stroke* 1994;25:1684-1687.
56. Kim JS, Lee JH, Lee MC. Small primary intracerebral hemorrhage. Clinical presentation of 28 cases. *Stroke* 1994;25:1500-1506.
57. Mayer SA, Sacco RL, Shi T, Mohr JP. Neurologic deterioration in noncomatose patients with supratentorial intracerebral hemorrhage. *Neurology* 1994;44:1379-1384.
58. Qureshi AI, Safdar K, Weil J, et al. Predictors of early deterioration and mortality in black Americans with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1995;26:1764-1767.
59. Kazui S, Naritomi H, Yamamoto H, Sawada T, Yamaguchi T. Enlargement of spontaneous intracerebral hemorrhage. Incidence and time course. *Stroke* 1996;27:1783-1787.
60. Kazui S, Minematsu K, Yamamoto H, Sawada T, Yamaguchi T. Predisposing factors to enlargement of spontaneous intracerebral hematoma. *Stroke* 1997;28:2370-2375.
61. Fujii Y, Takeuchi S, Sasaki O, Minakawa T, Tanaka R. Multivariate analysis of predictors of hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998;29:1160-1166.
62. Olson JD. Mechanisms of hemostasis. Effect on intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1993;24:1109-1114.
63. Mayer SA. Ultra-early hemostatic therapy for intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2003;34:224-229.
64. Mayer SA, Lignelli A, Fink ME, et al. Perilesional blood flow and edema formation in acute intracerebral hemorrhage: a SPECT study. *Stroke* 1998;29:1791-1798.
65. Zazulia AR, Diringner MN, Derdeyn CP, Powers WJ. Progression of mass effect after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1999;30:1167-1173.
66. Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Intracerebral hemorrhage versus infarction: stroke severity, risk factors, and prognosis. *Ann Neurol* 1995;38:45-50.
67. Vermeer SE, Algra A, Franke CL, Koudstaal PJ, Rinkel GJ. Long-term prognosis after recovery from primary intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2002;59:205-209.
68. Hemphill JC, 3rd, Bonovich DC, Besmertis L, Manley GT, Johnston SC. The ICH score: a simple, reliable grading scale for intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2001;32:891-897.
69. Hill MD, Silver FL, Austin PC, Tu JV. Rate of stroke recurrence in patients with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2000;31:123-127.
70. Karnik R, Valentin A, Ammerer HP, Hochfelner A, Donath P, Slany J. Outcome in patients with intracerebral hemorrhage: predictors of survival. *Wien Klin Wochenschr* 2000;112:169-173.
71. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Huster G. Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality. *Stroke* 1993;24:987-993.
72. Diringner MN, Edwards DF, Zazulia AR. Hydrocephalus: a previously unrecognized predictor of poor outcome from supratentorial intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998;29:1352-1357.
73. Qureshi AI, Suri MA, Safdar K, Ottenlips JR, Janssen RS, Frankel MR. Intracerebral hemorrhage in blacks. Risk factors, subtypes, and outcome. *Stroke* 1997;28:961-964.
74. Sloan MA, Sila CA, Mahaffey KW, et al. Prediction of 30-day mortality among patients with thrombolysis-related intracranial hemorrhage. *Circulation* 1998;98:1376-1382.
75. Qureshi AI, Bliwise DL, Bliwise NG, Akbar MS, Uzen G, Frankel MR. Rate of 24-hour blood pressure decline and mortality after spontaneous intracerebral hemorrhage: a retrospective analysis with a random effects regression model. *Crit Care Med* 1999;27:480-485.
76. Douglas MA, Haerer AF. Long-term prognosis of hypertensive intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1982;13:488-491.
77. Terayama Y, Tanahashi N, Fukuuchi Y, Gotoh F. Prognostic value of admission blood pressure in patients with intracerebral hemorrhage. *Keio Cooperative Stroke Study*. *Stroke* 1997;28:1185-1188.
78. Becker KJ, Baxter AB, Cohen WA, et al. Withdrawal of support in intracerebral hemorrhage may lead to self-fulfilling prophecies. *Neurology* 2001;56:766-772.
79. Hemphill JC, 3rd, Newman J, Zhao S, Johnston SC. Hospital usage of early do-not-resuscitate orders and outcome after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2004;35:1130-1134.

80. Diringer MN, Edwards DF. Admission to a neurologic/neurosurgical intensive care unit is associated with reduced mortality rate after intracerebral hemorrhage. *Crit Care Med* 2001;29:635-640.
81. Kothari RU, Brott T, Broderick JP, et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke* 1996;27:1304-1305.
82. Murai Y, Takagi R, Ikeda Y, Yamamoto Y, Teramoto A. Three-dimensional computerized tomography angiography in patients with hyperacute intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 1999;91:424-431.
83. Becker KJ, Baxter AB, Bybee HM, Tirschwell DL, Abouelsaad T, Cohen WA. Extravasation of radiographic contrast is an independent predictor of death in primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1999;30:2025-2032.
84. Allkemper T, Tombach B, Schwindt W, et al. Acute and subacute intracerebral hemorrhages: comparison of MR imaging at 1.5 and 3.0 T--initial experience. *Radiology* 2004;232:874-881.
85. Zhu XL, Chan MS, Poon WS. Spontaneous intracranial hemorrhage: which patients need diagnostic cerebral angiography? A prospective study of 206 cases and review of the literature. *Stroke* 1997;28:1406-1409.
86. Dandapani BK, Suzuki S, Kelley RE, Reyes-Iglesias Y, Duncan RC. Relation between blood pressure and outcome in intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1995;26:21-24.
87. Kaieda R, Todd MM, Cook LN, Warner DS. Acute effects of changing plasma osmolality and colloid oncotic pressure on the formation of brain edema after cryogenic injury. *Neurosurgery* 1989;24:671-678.
88. Passero S, Ciacci G, Ulivelli M. The influence of diabetes and hyperglycemia on clinical course after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2003;61:1351-1356.
89. Qureshi AI, Suarez JI. Use of hypertonic saline solutions in treatment of cerebral edema and intracranial hypertension. *Crit Care Med* 2000;28:3301-3313.
90. Gujjar AR, Deibert E, Manno EM, Duff S, Diringer MN. Mechanical ventilation for ischemic stroke and intracerebral hemorrhage: indications, timing, and outcome. *Neurology* 1998;51:447-451.
91. Passero S, Rocchi R, Rossi S, Ulivelli M, Vatti G. Seizures after spontaneous supratentorial intracerebral hemorrhage. *Epilepsia* 2002;43:1175-1180.
92. Qureshi AI, Wilson DA, Traystman RJ. Treatment of elevated intracranial pressure in experimental intracerebral hemorrhage: comparison between mannitol and hypertonic saline. *Neurosurgery* 1999;44:1055-1063; discussion 1063-1054.
93. Qureshi AI, Geocadin RG, Suarez JI, Ulatowski JA. Long-term outcome after medical reversal of transtentorial herniation in patients with supratentorial mass lesions. *Crit Care Med* 2000;28:1556-1564.
94. Pongvarin N, Bhoopat W, Viriyavejakul A, et al. Effects of dexamethasone in primary supratentorial intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 1987;316:1229-1233.
95. Tellez H, Bauer RB. Dexamethasone as treatment in cerebrovascular disease. 1. A controlled study in intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1973;4:541-546.
96. Tuhim S, Horowitz DR, Sacher M, Godbold JH. Volume of ventricular blood is an important determinant of outcome in supratentorial intracerebral hemorrhage. *Crit Care Med* 1999;27:617-621.
97. Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, et al. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2005;352:777-785.
98. Mendelow AD, Gregson BA, Fernandes HM, et al. Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the International Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage (STICH): a randomised trial. *Lancet* 2005;365:387-397.
99. Fernandes HM, Gregson B, Siddique S, Mendelow AD. Surgery in intracerebral hemorrhage. The uncertainty continues. *Stroke* 2000;31:2511-2516.
100. Rabinstein AA, Atkinson JL, Wijdicks EF. Emergency craniotomy in patients worsening due to expanded cerebral hematoma: to what purpose? *Neurology* 2002;58:1367-1372.
101. Auer LM, Deinsberger W, Niederkorn K, et al. Endoscopic surgery versus medical treatment for spontaneous intracerebral hematoma: a randomized study. *J Neurosurg* 1989;70:530-535.
102. Greenberg SM, Vonsattel JP. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke* 1997;28:1418-1422.

103. Itoh Y, Yamada M, Hayakawa M, Otomo E, Miyatake T. Cerebral amyloid angiopathy: a significant cause of cerebellar as well as lobar cerebral hemorrhage in the elderly. *J Neurol Sci* 1993;116:135-141.
104. Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, et al. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology* 1996;46:1592-1596.
105. Massaro AR, Sacco RL, Mohr JP, et al. Clinical discriminators of lobar and deep hemorrhages: the Stroke Data Bank. *Neurology* 1991;41:1881-1885.
106. Vonsattel JP, Myers RH, Hedley-Whyte ET, Ropper AH, Bird ED, Richardson EP, Jr. Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. *Ann Neurol* 1991;30:637-649.
107. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993;32:4693-4697.
108. Premkumar DR, Cohen DL, Hedera P, Friedland RP, Kalaria RN. Apolipoprotein E-epsilon4 alleles in cerebral amyloid angiopathy and cerebrovascular pathology associated with Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996;148:2083-2095.
109. Greenberg SM, Vonsattel JP, Segal AZ, et al. Association of apolipoprotein E epsilon2 and vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 1998;50:961-965.
110. Christie R, Yamada M, Moskowitz M, Hyman B. Structural and functional disruption of vascular smooth muscle cells in a transgenic mouse model of amyloid angiopathy. *Am J Pathol* 2001;158:1065-1071.
111. Wyss-Coray T, Masliah E, Mallory M, et al. Amyloidogenic role of cytokine TGF-beta1 in transgenic mice and in Alzheimer's disease. *Nature* 1997;389:603-606.
112. Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M. beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 1996;380:168-171.
113. Jenkins A, Maxwell WL, Graham DI. Experimental intracerebral haematoma in the rat: sequential light microscopical changes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989;15:477-486.
114. Lee KR, Colon GP, Betz AL, Keep RF, Kim S, Hoff JT. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. *J Neurosurg* 1996;84:91-96.
115. Xi G, Wagner KR, Keep RF, et al. Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998;29:2580-2586.
116. Kitaoka T, Hua Y, Xi G, Hoff JT, Keep RF. Delayed argatroban treatment reduces edema in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2002;33:3012-3018.
117. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats. *J Neurosurg* 1998;89:991-996.
118. Huang FP, Xi G, Keep RF, Hua Y, Nemoianu A, Hoff JT. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. *J Neurosurg* 2002;96:287-293.
119. Gong C, Hoff JT, Keep RF. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat. *Brain Res* 2000;871:57-65.
120. Wang J, Tsirka SE. Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2005;36:613-618.
121. Castillo J, Davalos A, Alvarez-Sabin J, et al. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2002;58:624-629.
122. Power C, Henry S, Del Bigio MR, et al. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol* 2003;53:731-742.
123. Xi G, Hua Y, Keep RF, Younger JG, Hoff JT. Brain edema after intracerebral hemorrhage: the effects of systemic complement depletion. *Acta Neurochir Suppl* 2002;81:253-256.
124. Palsdottir A, Abrahamson M, Thorsteinsson L, et al. Mutation in cystatin C gene causes hereditary brain haemorrhage. *Lancet* 1988;2:603-604.
125. Levy E, Lopez-Otin C, Ghiso J, Geltner D, Frangione B. Stroke in Icelandic patients with hereditary amyloid angiopathy is related to a mutation in the cystatin C gene, an inhibitor of cysteine proteases. *J Exp Med* 1989;169:1771-1778.
126. Vidal R, Frangione B, Rostagno A, et al. A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* 1999;399:776-781.
127. Mead S, James-Galton M, Revesz T, et al. Familial British dementia with amyloid angiopathy: early clinical, neuropsychological and imaging findings. *Brain* 2000;123 (Pt 5):975-991.

128. Vidal R, Garzuly F, Budka H, et al. Meningocerebrovascular amyloidosis associated with a novel transthyretin mis-sense mutation at codon 18 (TTRD 18G). *Am J Pathol* 1996;148:361-366.
129. Herrick MK, DeBruyne K, Horoupian DS, Skare J, Vanefsky MA, Ong T. Massive leptomeningeal amyloidosis associated with a Val30Met transthyretin gene. *Neurology* 1996;47:988-992.
130. Petersen RB, Goren H, Cohen M, et al. Transthyretin amyloidosis: a new mutation associated with dementia. *Ann Neurol* 1997;41:307-313.
131. Mascalchi M, Salvi F, Pirini MG, et al. Transthyretin amyloidosis and superficial siderosis of the CNS. *Neurology* 1999;53:1498-1503.
132. Brett M, Persey MR, Reilly MM, et al. Transthyretin Leu12Pro is associated with systemic, neuropathic and leptomeningeal amyloidosis. *Brain* 1999;122 (Pt 2):183-190.
133. Nochlin D, Bird TD, Nemens EJ, Ball MJ, Sumi SM. Amyloid angiopathy in a Volga German family with Alzheimer's disease and a presenilin-2 mutation (N141I). *Ann Neurol* 1998;43:131-135.
134. Yasuda M, Maeda S, Kawamata T, et al. Novel presenilin-1 mutation with widespread cortical amyloid deposition but limited cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:220-223.
135. Van Broeckhoven C, Haan J, Bakker E, et al. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science* 1990;248:1120-1122.
136. Miravalle L, Tokuda T, Chiarle R, et al. Substitutions at codon 22 of Alzheimer's abeta peptide induce diverse conformational changes and apoptotic effects in human cerebral endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:27110-27116.
137. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet* 1992;1:218-221.
138. Grabowski TJ, Cho HS, Vonsattel JP, Rebeck GW, Greenberg SM. Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 2001;49:697-705.
139. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, et al. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 1990;248:1124-1126.
140. Nilsberth C, Forsell C, Axelman K. A novel APP mutation (E693G). The Arctic mutation, causing Alzheimer's disease with vascular symptoms. *Soc Neurosci Abstr* 1999;25:297.
141. Tagliavini F, Rossi G, Padovani A. A new APP mutation related to hereditary cerebral haemorrhage. *Alzh. Reports* 1999;2:S28.
142. Gould DB, Phalan FC, Breedveld GJ, et al. Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. *Science* 2005;308:1167-1171.
143. van der Knaap MS, Smit LM, Barkhof F, et al. Neonatal porencephaly and adult stroke related to mutations in collagen IV A1. *Ann Neurol* 2006;59:504-511.
144. Breedveld G, de Coo IF, Lequin MH, et al. Novel mutations in three families confirm a major role of COL4A1 in hereditary porencephaly. *J Med Genet* 2006;43:490-495.
145. Gould DB, Phalan FC, van Mil SE, et al. Role of COL4A1 in small-vessel disease and hemorrhagic stroke. *N Engl J Med* 2006;354:1489-1496.
146. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996;383:707-710.
147. Lesnik Oberstein SA, van den Boom R, van Buchem MA, et al. Cerebral microbleeds in CADASIL. *Neurology* 2001;57:1066-1070.
148. Choi JC, Kang SY, Kang JH, Park JK. Intracerebral hemorrhages in CADASIL. *Neurology* 2006;67:2042-2044.
149. Greenberg SM, Rebeck GW, Vonsattel JP, Gomez-Isla T, Hyman BT. Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1995;38:254-259.
150. Garcia C, Pinho e Melo T, Rocha L, Lechner MC. Cerebral hemorrhage and apoE. *J Neurol* 1999;246:830-834.
151. Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E. Lack of an association between apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral amyloid angiopathy in elderly Japanese. *Ann Neurol* 1996;39:683-684.

152. Chowdhury AH, Yokoyama T, Kokubo Y, Zaman MM, Haque A, Tanaka H. Apolipoprotein E genetic polymorphism and stroke subtypes in a Bangladeshi hospital-based study. *J Epidemiol* 2001;11:131-138.
153. Nicoll JA, Burnett C, Love S, et al. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1997;41:716-721.
154. McCarron MO, Nicoll JA. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele is specific for patients with cerebral amyloid angiopathy-related haemorrhage. *Neurosci Lett* 1998;247:45-48.
155. Woo D, Sauerbeck LR, Kissela BM, et al. Genetic and environmental risk factors for intracerebral hemorrhage: preliminary results of a population-based study. *Stroke* 2002;33:1190-1195.
156. Alberts MJ, Graffagnino C, McClenny C, et al. ApoE genotype and survival from intracerebral haemorrhage. *Lancet* 1995;346:575.
157. Wang Y, Zhang W, Zhang Y, et al. VKORC1 haplotypes are associated with arterial vascular diseases (stroke, coronary heart disease, and aortic dissection). *Circulation* 2006;113:1615-1621.
158. Yamada Y, Metoki N, Yoshida H, et al. Genetic risk for ischemic and hemorrhagic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1920-1925.
159. Catto AJ, Kohler HP, Bannan S, Stickland M, Carter A, Grant PJ. Factor XIII Val 34 Leu: a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998;29:813-816.
160. Cho KH, Kim BC, Kim MK, Shin BA. No association of factor XIII Val34Leu polymorphism with primary intracerebral hemorrhage and healthy controls in Korean population. *J Korean Med Sci* 2002;17:249-253.
161. Corral J, Iniesta JA, Gonzalez-Conejero R, Villalon M, Vicente V. Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. *Blood* 2001;97:2979-2982.
162. Endler G, Funk M, Haering D, et al. Is the factor XIII 34Val/Leu polymorphism a protective factor for cerebrovascular disease? *Br J Haematol* 2003;120:310-314.
163. Corral J, Iniesta JA, Gonzalez-Conejero R, Villalon M, Rivera J, Vicente V. Factor XIII Val34Leu polymorphism in primary intracerebral haemorrhage. *Hematol J* 2000;1:269-273.
164. Reiner AP, Schwartz SM, Frank MB, et al. Polymorphisms of coagulation factor XIII subunit A and risk of nonfatal hemorrhagic stroke in young white women. *Stroke* 2001;32:2580-2586.
165. Alberts MJ, Davis JP, Graffagnino C, et al. Endoglin gene polymorphism as a risk factor for sporadic intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol* 1997;41:683-686.
166. Yoshida H, Imaizumi T, Fujimoto K, et al. A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val279Phe) is a genetic risk factor for cerebral hemorrhage but not for hypertension. *Thromb Haemost* 1998;80:372-375.
167. Catto A, Carter AM, Barrett JH, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and cerebrovascular disease. *Stroke* 1996;27:435-440.
168. Slowik A, Turaj W, Dziedzic T, et al. DD genotype of ACE gene is a risk factor for intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2004;63:359-361.
169. Sun L, Li Z, Zhang H, et al. Pentanucleotide TTTTA repeat polymorphism of apolipoprotein(a) gene and plasma lipoprotein(a) are associated with ischemic and hemorrhagic stroke in Chinese: a multicenter case-control study in China. *Stroke* 2003;34:1617-1622.
170. Xia J, Yang QD, Yang QM, et al. Apolipoprotein H gene polymorphisms and risk of primary cerebral hemorrhage in a Chinese population. *Cerebrovasc Dis* 2004;17:197-203.
171. Iniesta JA, Corral J, Gonzalez-Conejero R, Piqueras C, Vicente V. Polymorphisms of platelet adhesive receptors: do they play a role in primary intracerebral hemorrhage? *Cerebrovasc Dis* 2003;15:51-55.
172. MO MC, Muir KW, Weir CJ, et al. The apolipoprotein E epsilon4 allele and outcome in cerebrovascular disease. *Stroke* 1998;29:1882-1887.
173. Pera J, Slowik A, Dziedzic T, Szczudlik A. SERPINA3 polymorphism is not associated with primary intracerebral hemorrhage in a Polish population. *Stroke* 2006;37:906-907.
174. McCarron MO, Stewart J, McCarron P, et al. Association between interleukin-1A polymorphism and cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage. *Stroke* 2003;34:e193-195.
175. Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* 1983;52:655-709.

176. Berninger RW. Protease inhibitors of human plasma. Alpha 1-antichymotrypsin. *J Med* 1985;16:101-128.
177. Gendler SJ, Tokes ZA. Active proteinase inhibitors associated with human breast epithelial cells. *J Cell Biochem* 1984;26:157-167.
178. Kalsheker NA. Alpha 1-antichymotrypsin. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:961-964.
179. Morgan K, Licastro F, Tilley L, et al. Polymorphism in the alpha(1)-antichymotrypsin (ACT) gene promoter: effect on expression in transfected glial and liver cell lines and plasma ACT concentrations. *Hum Genet* 2001;109:303-310.
180. Pasternack JM, Abraham CR, Van Dyke BJ, Potter H, Younkin SG. Astrocytes in Alzheimer's disease gray matter express alpha 1-antichymotrypsin mRNA. *Am J Pathol* 1989;135:827-834.
181. Licastro F, Chiappelli M, Thal LJ, Masliah E. alpha-1-Antichymotrypsin polymorphism in the gene promoter region affects survival and synapsis loss in Alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr Suppl* 2004:243-251.
182. Crowther DC, Evans DL, Carrell RW. Serpins: implications of a mobile reactive centre. *Curr Opin Biotechnol* 1992;3:399-407.
183. Carrell RW, Whisstock J, Lomas DA. Conformational changes in serpins and the mechanism of alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:S171-175.
184. Baumann U, Huber R, Bode W, Grosse D, Lesjak M, Laurell CB. Crystal structure of cleaved human alpha 1-antichymotrypsin at 2.7 Å resolution and its comparison with other serpins. *J Mol Biol* 1991;218:595-606.
185. Potempa J, Fedak D, Dubin A, Mast A, Travis J. Proteolytic inactivation of alpha-1-anti-chymotrypsin. Sites of cleavage and generation of chemotactic activity. *J Biol Chem* 1991;266:21482-21487.
186. Kurdowska A, Travis J. Acute phase protein stimulation by alpha 1-antichymotrypsin-cathepsin G complexes. Evidence for the involvement of interleukin-6. *J Biol Chem* 1990;265:21023-21026.
187. Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology* 1997;48:921-926.
188. Abraham CR. The role of the acute-phase protein alpha 1-antichymotrypsin in brain dysfunction and injury. *Res Immunol* 1992;143:631-636.
189. Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 1988;52:487-501.
190. Hof P, Mayr I, Huber R, et al. The 1.8 Å crystal structure of human cathepsin G in complex with Suc-Val-Pro-PheP-(OPh)₂: a Janus-faced proteinase with two opposite specificities. *Embo J* 1996;15:5481-5491.
191. Roughley PJ, Barrett AJ. The degradation of cartilage proteoglycans by tissue proteinases. Proteoglycan structure and its susceptibility to proteolysis. *Biochem J* 1977;167:629-637.
192. Legedz L, Randon J, Sessa C, et al. Cathepsin G is associated with atheroma formation in human carotid artery. *J Hypertens* 2004;22:157-166.
193. Duranton J, Adam C, Bieth JG. Kinetic mechanism of the inhibition of cathepsin G by alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochemistry* 1998;37:11239-11245.
194. Janciauskiene S, Wright HT. Inflammation, antichymotrypsin, and lipid metabolism: autogenic etiology of Alzheimer's disease. *Bioessays* 1998;20:1039-1046.
195. Forsyth KD, Talbot V, Beckman I. Endothelial serpins--protectors of the vasculature? *Clin Exp Immunol* 1994;95:277-282.
196. Ma J, Yee A, Brewer HB, Jr., Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 1994;372:92-94.
197. Zhang S, Janciauskiene S. Multi-functional capability of proteins: alpha1-antichymotrypsin and the correlation with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2002;4:115-122.
198. Nilsson LN, Bales KR, DiCarlo G, et al. Alpha-1-antichymotrypsin promotes beta-sheet amyloid plaque deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001;21:1444-1451.

199. Mucke L, Yu GQ, McConlogue L, Rockenstein EM, Abraham CR, Masliah E. Astroglial expression of human alpha(1)-antichymotrypsin enhances alzheimer-like pathology in amyloid protein precursor transgenic mice. *Am J Pathol* 2000;157:2003-2010.
200. Janciauskiene S, Rubin H, Lukacs CM, Wright HT. Alzheimer's peptide Abeta1-42 binds to two beta-sheets of alpha1-antichymotrypsin and transforms it from inhibitor to substrate. *J Biol Chem* 1998;273:28360-28364.
201. Sun YX, Wright HT, Janciauskiene S. Glioma cell activation by Alzheimer's peptide Abeta1-42, alpha1-antichymotrypsin, and their mixture. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1734-1743.
202. Licastro F, Campbell IL, Kincaid C, et al. A role for apoE in regulating the levels of alpha-1-antichymotrypsin in the aging mouse brain and in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1999;155:869-875.
203. Licastro F, Mallory M, Hansen LA, Masliah E. Increased levels of alpha-1-antichymotrypsin in brains of patients with Alzheimer's disease correlate with activated astrocytes and are affected by APOE 4 genotype. *J Neuroimmunol* 1998;88:105-110.
204. Schuster MG, Enriquez PM, Curran P, Cooperman BS, Rubin H. Regulation of neutrophil superoxide by antichymotrypsin-chymotrypsin complexes. *J Biol Chem* 1992;267:5056-5059.
205. Kilpatrick L, McCawley L, Nachiappan V, et al. Alpha-1-antichymotrypsin inhibits the NADPH oxidase-enzyme complex in phorbol ester-stimulated neutrophil membranes. *J Immunol* 1992;149:3059-3065.
206. Kanai H, Tanaka M, Hirai S. Alpha 1-antichymotrypsin has a trophic effect on hippocampal neurons in vitro. *Neurosci Lett* 1991;125:163-165.
207. Mizuguchi M, Kim SU. Alpha 1-antichymotrypsin supports short-term survival of cerebral neurons in culture. *Neurosci Lett* 1991;124:166-168.
208. Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21:383-421.
209. Matsubara E, Hirai S, Amari M, et al. Alpha 1-antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol* 1990;28:561-567.
210. Lieberman J, Schleissner L, Tachiki KH, Kling AS. Serum alpha 1-antichymotrypsin level as a marker for Alzheimer-type dementia. *Neurobiol Aging* 1995;16:747-753.
211. Licastro F, Parnetti L, Morini MC, et al. Acute phase reactant alpha 1-antichymotrypsin is increased in cerebrospinal fluid and serum of patients with probable Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1995;9:112-118.
212. Pirttila T, Mehta PD, Frey H, Wisniewski HM. Alpha 1-antichymotrypsin and IL-1 beta are not increased in CSF or serum in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1994;15:313-317.
213. Furiya Y, Hirano M, Kurumatani N, et al. Alpha-1-antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to multiple system atrophy (MSA). *Brain Res Mol Brain Res* 2005;138:178-181.
214. Byth BC, Billingsley GD, Cox DW. Physical and genetic mapping of the serpin gene cluster at 14q32.1: allelic association and a unique haplotype associated with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Hum Genet* 1994;55:126-133.
215. Bao JJ, Sifers RN, Kidd VJ, Ledley FD, Woo SL. Molecular evolution of serpins: homologous structure of the human alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-antitrypsin genes. *Biochemistry* 1987;26:7755-7759.
216. Chandra T, Stackhouse R, Kidd VJ, Robson KJ, Woo SL. Sequence homology between human alpha 1-antichymotrypsin, alpha 1-antitrypsin, and antithrombin III. *Biochemistry* 1983;22:5055-5061.
217. Faber JP, Poller W, Olek K, et al. The molecular basis of alpha 1-antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease. *J Hepatol* 1993;18:313-321.
218. Randall LL, Hardy SJ. Unity in function in the absence of consensus in sequence: role of leader peptides in export. *Science* 1989;243:1156-1159.
219. Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1-antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet* 1995;10:486-488.
220. Licastro F, Pedrini S, Ferri C, et al. Gene polymorphism affecting alpha1-antichymotrypsin and interleukin-1 plasma levels increases Alzheimer's disease risk. *Ann Neurol* 2000;48:388-391.
221. Nilsson LN, Das S, Potter H. Effect of cytokines, dexamethasone and the A/T-signal peptide polymorphism on the expression of alpha(1)-antichymotrypsin in astrocytes: significance for Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001;39:361-370.

222. Wang X, DeKosky ST, Ikonovic MD, Kamboh MI. Distribution of plasma alpha 1-antichymotrypsin levels in Alzheimer disease patients and controls and their genetic controls. *Neurobiol Aging* 2002;23:377-382.
223. McIlroy SP, Vahidassr MD, Savage DA, et al. Association of serum AACT levels and AACT signal polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in Northern Ireland. *Int J Geriatr Psychiatry* 2000;15:260-266.
224. Scacchi R, Ruggeri M, Gambina G, Martini MC, Ferrari G, Corbo RM. Plasma alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease; relationships with APOE genotypes. *Neurobiol Aging* 2001;22:413-416.
225. Ezquerra M, Blesa R, Tolosa E, Ballesta F, Oliva R. Alpha-antichymotrypsin gene polymorphism and risk for Alzheimer's disease in the Spanish population. *Neurosci Lett* 1998;240:107-109.
226. Talbot C, Houlden H, Craddock N, et al. Polymorphism in AACT gene may lower age of onset of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1996;7:534-536.
227. Haines JL, Pritchard ML, Saunders AM, et al. No genetic effect of alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer disease. *Genomics* 1996;33:53-56.
228. Nacmias B, Tedde A, Latorraca S, et al. Apolipoprotein E and alpha1-antichymotrypsin polymorphism in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996;40:678-680.
229. Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, et al. Association of alpha1-antichymotrypsin polymorphism with cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1998;44:129-131.
230. Durany N, Ravid R, Riederer P, Cruz-Sanchez FF. Increased frequency of the alpha-1-antichymotrypsin T allele in cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathology* 2000;20:184-189.
231. Yamamoto M, Kondo I, Ogawa N, Asanuma M, Yamashita Y, Mizuno Y. Genetic association between susceptibility to Parkinson's disease and alpha1-antichymotrypsin polymorphism. *Brain Res* 1997;759:153-155.
232. Munoz E, Obach V, Oliva R, et al. Alpha1-antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Neurology* 1999;52:297-301.
233. Grasbon-Frodl EM, Egensperger R, Kosel S, et al. The alpha1-antichymotrypsin A-allele in German Parkinson disease patients. *J Neural Transm* 1999;106:729-736.
234. Wang J, Zhao CY, Si YM, Liu ZL, Chen B, Yu L. ACT and UCH-L1 polymorphisms in Parkinson's disease and age of onset. *Mov Disord* 2002;17:767-771.
235. Obach V, Revilla M, Vila N, Cervera AA, Chamorro AA. alpha(1)-antichymotrypsin polymorphism: a risk factor for hemorrhagic stroke in normotensive subjects. *Stroke* 2001;32:2588-2591.
236. Vila N, Obach V, Revilla M, Oliva R, Chamorro A. Alpha(1)-antichymotrypsin gene polymorphism in patients with stroke. *Stroke* 2000;31:2103-2105.
237. Fu Y, Xie R, Wang Y, et al. [Association between alpha-1-antichymotrypsin gene polymorphism and cerebral hemorrhage]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002;82:915-917.
238. Slowik A, Borratynska A, Turaj W, et al. Alpha1-antichymotrypsin gene (SERPINA3) A/T polymorphism as a risk factor for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2005;36:737-740.
239. Xiao HD, Fuchs S, Frenzel K, Teng L, Bernstein KE. Circulating versus local angiotensin II in blood pressure control: lessons from tissue-specific expression of angiotensin-converting enzyme (ACE). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14:137-145.
240. Natesh R, Schwager SL, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* 2003;421:551-554.
241. Lattion AL, Soubrier F, Allegrini J, Hubert C, Corvol P, Alhenc-Gelas F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett* 1989;252:99-104.
242. Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 1987;56:345-348.
243. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 2004;116:263-272.
244. Carluccio M, Soccio M, De Caterina R. Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system. *Eur J Clin Invest* 2001;31:476-488.
245. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916-1923.

246. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem* 1993;268:9496-9503.
247. Yokosawa H, Endo S, Ogura Y, Ishii S. A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: hydrolysis of substance P. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;116:735-742.
248. Lantz I, Thornwall M, Kihlstrom JE, Nyberg F. A comparison of human lung, brain, CSF and plasma angiotensin-converting enzyme with regard to neuropeptide metabolism. *Biochem Int* 1992;26:415-426.
249. Mellick GD, Buchanan DD, McCann SJ, et al. The ACE deletion polymorphism is not associated with Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1999;41:103-106.
250. Hong CJ, Wang YC, Tsai SJ. Association study of angiotensin I-converting enzyme polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. *J Neural Transm* 2002;109:1209-1214.
251. Arinami T, Li L, Mitsushio H, Itokawa M, Hamaguchi H, Toru M. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene is associated with both brain substance P contents and affective disorders. *Biol Psychiatry* 1996;40:1122-1127.
252. Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J Biol Chem* 2001;276:47863-47868.
253. Strittmatter SM, Thiele EA, Kapiloff MS, Snyder SH. A rat brain isozyme of angiotensin-converting enzyme. Unique specificity for amidated peptide substrates. *J Biol Chem* 1985;260:9825-9832.
254. Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D, Warnet JM, Corvol P. Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. *J Lab Clin Med* 1991;117:33-39.
255. Cambien F, Costerousse O, Tiret L, et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 1994;90:669-676.
256. El-Dorry HA, Pickett CB, MacGregor JS, Soffer RL. Tissue-specific expression of mRNAs for dipeptidyl carboxypeptidase isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:4295-4297.
257. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991;266:15377-15383.
258. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-1346.
259. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 1993;290 (Pt 1):33-40.
260. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995;92:1387-1388.
261. Ueda S, Elliott HL, Morton JJ, Connell JM. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 1995;25:1266-1269.
262. Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation* 2000;102:829-832.
263. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JC. ACE polymorphisms. *Circ Res* 2006;98:1123-1133.
264. Kammerer CM, Gouin N, Samollow PB, et al. Two quantitative trait loci affect ACE activities in Mexican-Americans. *Hypertension* 2004;43:466-470.
265. Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1997;15:1579-1592.
266. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:484-492.

267. Krege JH, Kim HS, Moyer JS, et al. Angiotensin-converting enzyme gene mutations, blood pressures, and cardiovascular homeostasis. *Hypertension* 1997;29:150-157.
268. Sayed-Tabatabaei FA, Houwing-Duistermaat JJ, van Duijn CM, Wittteman JC. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis. *Stroke* 2003;34:1634-1639.
269. Pfohl M, Athanasiadis A, Koch M, et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with coronary artery plaque calcification as assessed by intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:987-991.
270. Rasmussen LM, Ledet T. Aortic atherosclerosis in diabetes mellitus is associated with an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene. No relation between the polymorphism and aortic collagen content. *Diabetologia* 1996;39:696-700.
271. Lehmann DJ, Cortina-Borja M, Warden DR, et al. Large meta-analysis establishes the ACE insertion-deletion polymorphism as a marker of Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol* 2005;162:305-317.
272. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 1995;270:13757-13765.
273. Mora M, Carinci V, Bensi G, Raugi G, Buonamassa DT, Melli M. Differential expression of the human IL-1 alpha and beta genes. *Prog Clin Biol Res* 1990;349:205-216.
274. Stevenson FT, Torrano F, Locksley RM, Lovett DH. Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *J Cell Physiol* 1992;152:223-231.
275. Kobayashi Y, Appella E, Yamada M, Copeland TD, Oppenheim JJ, Matsushima K. Phosphorylation of intracellular precursors of human IL-1. *J Immunol* 1988;140:2279-2287.
276. Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5548-5552.
277. Miller AC, Schattenberg DG, Malkinson AM, Ross D. Decreased content of the IL1 alpha processing enzyme calpain in murine bone marrow-derived macrophages after treatment with the benzene metabolite hydroquinone. *Toxicol Lett* 1994;74:177-184.
278. Watanabe N, Kobayashi Y. Selective release of a processed form of interleukin 1 alpha. *Cytokine* 1994;6:597-601.
279. Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH. The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:7245-7249.
280. Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:1204-1208.
281. Brody DT, Durum SK. Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol* 1989;143:1183-1187.
282. Labriola-Tompkins E, Chandran C, Varnell TA, Madison VS, Ju G. Structure-function analysis of human IL-1 alpha: identification of residues required for binding to the human type I IL-1 receptor. *Protein Eng* 1993;6:535-539.
283. Grutter MG, van Oostrum J, Priestle JP, et al. A mutational analysis of receptor binding sites of interleukin-1 beta: differences in binding of human interleukin-1 beta muteins to human and mouse receptors. *Protein Eng* 1994;7:663-671.
284. Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *Embo J* 1990;9:1503-1510.
285. Fenton MJ, Vermeulen MW, Clark BD, Webb AC, Auron PE. Human pro-IL-1 beta gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. *J Immunol* 1988;140:2267-2273.
286. Jarrous N, Kaempfer R. Induction of human interleukin-1 gene expression by retinoic acid and its regulation at processing of precursor transcripts. *J Biol Chem* 1994;269:23141-23149.
287. Schindler R, Ghezzi P, Dinarello CA. IL-1 induces IL-1. IV. IFN-gamma suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *J Immunol* 1990;144:2216-2222.
288. Serkkola E, Hurme M. Synergism between protein-kinase C and cAMP-dependent pathways in the expression of the interleukin-1 beta gene is mediated via the activator-protein-1 (AP-1) enhancer activity. *Eur J Biochem* 1993;213:243-249.
289. Jobling SA, Auron PE, Gurka G, et al. Biological activity and receptor binding of human prointerleukin-1 beta and subpeptides. *J Biol Chem* 1988;263:16372-16378.

290. Bakouche O, Brown DC, Lachman LB. Subcellular localization of human monocyte interleukin 1: evidence for an inactive precursor molecule and a possible mechanism for IL 1 release. *J Immunol* 1987;138:4249-4255.
291. Black RA, Kronheim SR, Cantrell M, et al. Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J Biol Chem* 1988;263:9437-9442.
292. Sims JE, March CJ, Cosman D, et al. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 1988;241:585-589.
293. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, et al. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *Embo J* 1991;10:2821-2832.
294. Sims JE, Painter SL, Gow IR. Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors. *Cytokine* 1995;7:483-490.
295. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:7907-7911.
296. Furutani Y, Notake M, Fukui T, et al. Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. *Nucleic Acids Res* 1986;14:3167-3179.
297. Clark BD, Collins KL, Gandy MS, Webb AC, Auron PE. Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene. *Nucleic Acids Res* 1986;14:7897-7914.
298. Lafage M, Maroc N, Dubreuil P, et al. The human interleukin-1 alpha gene is located on the long arm of chromosome 2 at band q13. *Blood* 1989;73:104-107.
299. Bensi G, Mora M, Raugei G, Buonamassa DT, Rossini M, Melli M. An inducible enhancer controls the expression of the human interleukin 1 beta gene. *Cell Growth Differ* 1990;1:491-497.
300. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:1670-1674.
301. Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1075-1079.
302. di Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta). *Hum Mol Genet* 1992;1:450.
303. Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol* 1998;47:195-198.
304. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398-402.
305. Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, et al. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis Rheum* 2004;50:1976-1983.
306. Licastro F, Chiappelli M, Caldarera CM, et al. The concomitant presence of polymorphic alleles of interleukin-1beta, interleukin-6 and apolipoprotein E is associated with an increased risk of myocardial infarction in elderly men. Results from a pilot study. *Mech Ageing Dev* 2004;125:575-579.
307. Nishimura M, Kawakami H, Komure O, et al. Contribution of the interleukin-1beta gene polymorphism in multiple system atrophy. *Mov Disord* 2002;17:808-811.
308. Mann CL, Davies MB, Stevenson VL, et al. Interleukin 1 genotypes in multiple sclerosis and relationship to disease severity. *J Neuroimmunol* 2002;129:197-204.
309. Mattila KM, Rinne JO, Lehtimaki T, Roytta M, Ahonen JP, Hurme M. Association of an interleukin 1B gene polymorphism (-511) with Parkinson's disease in Finnish patients. *J Med Genet* 2002;39:400-402.
310. Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kuno S. Influence of interleukin-1beta gene polymorphisms on age-at-onset of sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2000;284:73-76.
311. Reich K, Mossner R, Konig IR, Westphal G, Ziegler A, Neumann C. Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *J Invest Dermatol* 2002;118:155-163.
312. Zanardini R, Bocchio-Chiavetto L, Scassellati C, et al. Association between IL-1beta -511C/T and IL-1RA (86bp)n repeats polymorphisms and schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2003;37:457-462.

313. Craig D, Hart DJ, McCool K, McIlroy SP, Passmore AP. The interleukin 1beta gene promoter polymorphism (-511) acts as a risk factor for psychosis in Alzheimer's dementia. *Ann Neurol* 2004;56:121-124.
314. Nemetz A, Nosti-Escanilla MP, Molnar T, et al. IL1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* 1999;49:527-531.
315. Parks CG, Cooper GS, Dooley MA, et al. Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States. *Ann Rheum Dis* 2004;63:91-94.
316. Muraki Y, Tsutsumi A, Takahashi R, et al. Polymorphisms of IL-1 beta gene in Japanese patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004;31:720-725.
317. Virta M, Hurme M, Helminen M. Increased frequency of interleukin-1beta (-511) allele 2 in febrile seizures. *Pediatr Neurol* 2002;26:192-195.
318. Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M. Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2000;47:571-574.
319. Schulte T, Schols L, Muller T, Woitalla D, Berger K, Kruger R. Polymorphisms in the interleukin-1 alpha and beta genes and the risk for Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2002;326:70-72.
320. McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Association of interleukin-1 beta polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2002;326:67-69.
321. Marculescu R, Mlekusch W, Exner M, et al. Interleukin-1 cluster combined genotype and restenosis after balloon angioplasty. *Thromb Haemost* 2003;90:491-500.
322. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995;38:221-228.
323. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res* 2000;79:1864-1869.
324. Hulkkonen J, Laippala P, Hurme M. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:251-255.
325. Kawaguchi Y, Hara M, Kamatani N, Wright TM. Identification of an IL1A gene segment that determines aberrant constitutive expression of interleukin-1 alpha in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:193-202.
326. Karasneh J, Hajeer AH, Barrett J, Ollier WE, Thornhill M, Gul A. Association of specific interleukin 1 gene cluster polymorphisms with increased susceptibility for Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:860-864.
327. Hutyrova B, Pantelidis P, Drabek J, et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:148-151.
328. Ravindran JS, Owen P, Lagan A, et al. Interleukin 1alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor gene polymorphisms in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:22-26.
329. Sciacca FL, Ferri C, Veglia F, et al. IL-1 genes in myasthenia gravis: IL-1A -889 polymorphism associated with sex and age of disease onset. *J Neuroimmunol* 2002;122:94-99.
330. Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, et al. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. *Ann Neurol* 2000;47:361-365.
331. Um JY, Moon KS, Lee KM, Kim HM. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in cerebral infarction. *Cytokine* 2003;23:41-46.
332. Hutyrova B, Lukac J, Bosak V, Buc M, du Bois R, Petrek M. Interleukin 1alpha single-nucleotide polymorphism associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31:81-84.
333. Combarros O, Infante J, Llorca J, Berciano J. Interleukin-1A (-889) genetic polymorphism increases the risk of multiple system atrophy. *Mov Disord* 2003;18:1385-1386.
334. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:734-744.
335. Lu A, Tang Y, Ran R, Ardizzone TL, Wagner KR, Sharp FR. Brain genomics of intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:230-252.

336. Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK. Experimental brain injury induces expression of interleukin-1 beta mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;30:125-130.
337. Qureshi AI, Suri MF, Ling GS, Khan J, Guterman LR, Hopkins LN. Absence of early proinflammatory cytokine expression in experimental intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery* 2001;49:416-420; discussion 421.
338. Griffin WS, Sheng JG, Gentleman SM, Graham DI, Mrak RE, Roberts GW. Microglial interleukin-1 alpha expression in human head injury: correlations with neuronal and neuritic beta-amyloid precursor protein expression. *Neurosci Lett* 1994;176:133-136.
339. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147.
340. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, et al. Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2007-2012.
341. Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000;17:927-938.
342. Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol* 1992;263:C1-16.
343. Blasi F, Riccio M, Brogi A, et al. Constitutive expression of interleukin-1beta (IL-1beta) in rat oligodendrocytes. *Biol Chem* 1999;380:259-264.
344. Patel HC, Boutin H, Allan SM. Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2003;992:39-47.
345. Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J Neurotrauma* 2005;22:885-895.
346. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci* 2001;21:5528-5534.
347. Rothwell NJ. Sixteenth Gaddum Memorial Lecture December 1996. Neuroimmune interactions: the role of cytokines. *Br J Pharmacol* 1997;121:841-847.
348. Tehranian R, Andell-Jonsson S, Beni SM, et al. Improved recovery and delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist. *J Neurotrauma* 2002;19:939-951.
349. Betz AL, Yang GY, Davidson BL. Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:547-551.
350. Loddick SA, Wong ML, Bongiorno PB, Gold PW, Licinio J, Rothwell NJ. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:211-215.
351. Huang J, Gao X, Li S, Cao Z. Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12829-12832.
352. Kuno K, Matsushima K. The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol* 1994;56:542-547.
353. O'Neill LA, Greene C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998;63:650-657.
354. Zhang S, Han J, Sells MA, et al. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* 1995;270:23934-23936.
355. Legos JJ, Erhardt JA, White RF, et al. SB 239063, a novel p38 inhibitor, attenuates early neuronal injury following ischemia. *Brain Res* 2001;892:70-77.
356. Namura S, Iihara K, Takami S, et al. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11569-11574.
357. Plata-Salaman CR, French-Mullen JM. Interleukin-1 beta depresses calcium currents in CA1 hippocampal neurons at pathophysiological concentrations. *Brain Res Bull* 1992;29:221-223.
358. Murray CA, McGahon B, McBennett S, Lynch MA. Interleukin-1 beta inhibits glutamate release in hippocampus of young, but not aged, rats. *Neurobiol Aging* 1997;18:343-348.
359. Katsuki H, Nakai S, Hirai Y, Akaji K, Kiso Y, Satoh M. Interleukin-1 beta inhibits long-term potentiation in the CA3 region of mouse hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 1990;181:323-326.

360. Zeise ML, Madamba S, Siggins GR. Interleukin-1 beta increases synaptic inhibition in rat hippocampal pyramidal neurons in vitro. *Regul Pept* 1992;39:1-7.
361. Serou MJ, DeCoster MA, Bazan NG. Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. *J Neurosci Res* 1999;58:593-598.
362. Roe SY, McGowan EM, Rothwell NJ. Evidence for the involvement of corticotrophin-releasing hormone in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 1998;10:553-559.
363. Giulian D, Vaca K, Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J Neurosci* 1993;13:29-37.
364. Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 1992;587:250-256.
365. Kordula T, Bugno M, Rydel RE, Travis J. Mechanism of interleukin-1- and tumor necrosis factor alpha-dependent regulation of the alpha 1-antichymotrypsin gene in human astrocytes. *J Neurosci* 2000;20:7510-7516.
366. Bellander BM, von Holst H, Fredman P, Svensson M. Activation of the complement cascade and increase of clusterin in the brain following a cortical contusion in the adult rat. *J Neurosurg* 1996;85:468-475.
367. Carman-Krzan M, Vige X, Wise BC. Regulation by interleukin-1 of nerve growth factor secretion and nerve growth factor mRNA expression in rat primary astroglial cultures. *J Neurochem* 1991;56:636-643.
368. Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, Betz AL. Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:180-185.
369. Loddick SA, MacKenzie A, Rothwell NJ. An ICE inhibitor, z-VAD-DCB attenuates ischaemic brain damage in the rat. *Neuroreport* 1996;7:1465-1468.
370. Tamaru M, Tomura K, Sakamoto S, Tezuka K, Tamatani T, Narumi S. Interleukin-1beta induces tissue- and cell type-specific expression of adhesion molecules in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1292-1303.
371. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol* 1985;121:394-403.
372. Ohsuzu F. The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb* 2004;11:313-321.
373. Moyer CF, Sajuthi D, Tulli H, Williams JK. Synthesis of IL-1 alpha and IL-1 beta by arterial cells in atherosclerosis. *Am J Pathol* 1991;138:951-960.
374. Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res* 2001;88:877-887.
375. Elhage R, Maret A, Pieraggi MT, Thiers JC, Arnal JF, Bayard F. Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1998;97:242-244.
376. Isoda K, Shiigai M, Ishigami N, et al. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation* 2003;108:516-518.
377. Devlin CM, Kuriakose G, Hirsch E, Tabas I. Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6280-6285.
378. Isoda K, Sawada S, Ishigami N, et al. Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1068-1073.
379. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, et al. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:656-660.
380. Chi H, Messas E, Levine RA, Graves DT, Amar S. Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation* 2004;110:1678-1685.
381. Nicklin MJ, Hughes DE, Barton JL, Ure JM, Duff GW. Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. *J Exp Med* 2000;191:303-312.
382. Esmon CT. Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999;12:343-359.

383. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1984;160:618-623.
384. Schorer AE, White JG. Interleukin 1 enhances arterial thrombogenicity in vitro. *Thromb Res* 1989;56:515-522.
385. Osnes LT, Westvik AB, Joo GB, Okkenhaug C, Kierulf P. Inhibition of IL-1 induced tissue factor (TF) synthesis and procoagulant activity (PCA) in purified human monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13. *Cytokine* 1996;8:822-827.
386. Murakami N, Sakata Y, Watanabe T. Central action sites of interleukin-1 beta for inducing fever in rabbits. *J Physiol* 1990;428:299-312.
387. Brenneman DE, Schultzberg M, Bartfai T, Gozes I. Cytokine regulation of neuronal survival. *J Neurochem* 1992;58:454-460.
388. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000;74:1-20.
389. Csuka E, Hans VH, Ammann E, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. *Neuroreport* 2000;11:2587-2590.
390. Rothwell NJ. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:430-436.
391. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993;54:167-227.
392. Malyak M, Smith MF, Jr., Abel AA, Hance KR, Arend WP. The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes. *J Immunol* 1998;161:2004-2010.
393. Muzio M, Polentarutti N, Sironi M, et al. Cloning and characterization of a new isoform of the interleukin 1 receptor antagonist. *J Exp Med* 1995;182:623-628.
394. Malyak M, Guthridge JM, Hance KR, Dower SK, Freed JH, Arend WP. Characterization of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 1998;161:1997-2003.
395. Arend WP, Guthridge CJ. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis* 2000;59 Suppl 1:i60-64.
396. Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest* 1997;99:2930-2940.
397. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:323-340.
398. Greenfeder SA, Varnell T, Powers G, et al. Insertion of a structural domain of interleukin (IL)-1 beta confers agonist activity to the IL-1 receptor antagonist. Implications for IL-1 bioactivity. *J Biol Chem* 1995;270:22460-22466.
399. Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics* 1992;13:654-657.
400. Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993;91:403-404.
401. Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 1995;99:303-310.
402. Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2394-2400.
403. Teasdale G, Murray G, Parker L, Jennett B. Adding up the Glasgow Coma Score. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1979;28:13-16.
404. Hadjigeorgiou GM, Paterakis K, Dardiotis E, et al. IL-1RN and IL-1B gene polymorphisms and cerebral hemorrhagic events after traumatic brain injury. *Neurology* 2005;65:1077-1082.
405. van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke* 1988;19:604-607.
406. Sambrook, Fritsch, Μανιάτης. Molecular cloning, A Laboratory Manual. In, Second Edition ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
407. Kantarci OH, Atkinson EJ, Hebrink DD, McMurray CT, Weinshenker BG. Association of two variants in IL-1beta and IL-1 receptor antagonist genes with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000;106:220-227.

408. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl* 1993;3:120-121.
409. Abraham CR, Kanemaru K, Mucke L. Expression of cathepsin G-like and alpha 1-antichymotrypsin-like proteins in reactive astrocytes. *Brain Res* 1993;621:222-232.
410. Lieb K, Fiebich BL, Schaller H, Berger M, Bauer J. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce expression of alpha 1-antichymotrypsin in human astrocytoma cells by activation of nuclear factor-kappa B. *J Neurochem* 1996;67:2039-2044.
411. Hausmann R, Betz P. Course of glial immunoreactivity for vimentin, tenascin and alpha1-antichymotrypsin after traumatic injury to human brain. *Int J Legal Med* 2001;114:338-342.
412. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 1995;18:130-136.
413. Tasci A, Okay O, Gezici AR, Ergun R, Ergungor F. Prognostic value of interleukin-1 beta levels after acute brain injury. *Neurol Res* 2003;25:871-874.
414. Lammie GA. Hypertensive cerebral small vessel disease and stroke. *Brain Pathol* 2002;12:358-370.
415. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology* 2000;20:8-22.
416. Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:267-274.
417. Strawn WB, Ferrario CM. Mechanisms linking angiotensin II and atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:505-512.
418. Johnson RJ, Couser WG, Alpers CE, Vissers M, Schulze M, Klebanoff SJ. The human neutrophil serine proteinases, elastase and cathepsin G, can mediate glomerular injury in vivo. *J Exp Med* 1988;168:1169-1174.
419. Delyani JA, Murohara T, Lefer AM. Novel recombinant serpin, LEX-032, attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *Am J Physiol* 1996;270:H881-887.
420. Ikari Y, Mulvihill E, Schwartz SM. alpha 1-Proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and alpha 2-macroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001;276:11798-11803.
421. Cardon LR, Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001;2:91-99.
422. Alberts MJ, McCarron MO, Hoffmann KL, Graffagnino C. Familial clustering of intracerebral hemorrhage: a prospective study in North Carolina. *Neuroepidemiology* 2002;21:18-21.
423. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, et al. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest* 1994;94:978-984.
424. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, et al. Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol* 2004;165:1019-1032.
425. Veniant M, Menard J, Bruneval P, Morley S, Gonzales MF, Mullins J. Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *J Clin Invest* 1996;98:1966-1970.
426. Kantachuvesiri S, Haley CS, Fleming S, et al. Genetic mapping of modifier loci affecting malignant hypertension in TGRmRen2 rats. *Kidney Int* 1999;56:414-420.
427. Montgomery HE, Kiernan LA, Whitworth CE, et al. Inhibition of tissue angiotensin converting enzyme activity prevents malignant hypertension in TGR(mREN2)27. *J Hypertens* 1998;16:635-643.