ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΡΑΝΙΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΚΑΚΩΣΗ

ΜΑΡΙΑΣ Γ. ΔΑΡΔΙΩΤΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΡΑΝΙΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΚΑΚΩΣΗ

ΜΑΡΙΑΣ Γ. ΔΑΡΔΙΩΤΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

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

(Νόμος 5343/32, άρθρο 202 παρ. 2)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ. ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ. (επιβλέπων)
Α. ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.
Π. ΚΟΛΛΙΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής Ανθρώπου

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α. ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.
Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ, Καθηγητής Πνευμονολογίας Π.Θ.
Κ. ΚΑΠΠΑΣ, Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής Π.Θ.
Γ. ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.
Π. ΚΟΛΛΙΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής Ανθρώπου
Κ. ΦΟΥΝΤΑΣ, Επίκουρος Καθηγητής Νευροχειρουργικής Π.Θ.
Κ. ΠΑΤΕΡΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Νευροχειρουργικής Π.Θ.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΟ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. Dardiotis E, Fountas K, Dardioti M, Xiromerisiou G, Kapsalaki E, Tasiou A, Hadjigeorgiou G. **Genetic Association Studies in Patients with Traumatic Brain Injury**. Neurosurgical focus. 2010;28(1):E9

2. Dardiotis E, Dardioti M, Hadjigeorgiou GM, Paterakis K. **Lack of association between the IL1A gene (-889) polymorphism and outcome after head injury.** Surg Neurol. 2006;66(3):334-5.

3. Hadjigeorgiou GM, Paterakis K, Dardiotis E, Dardioti M, Aggelakis K, Tasiou A, Xiromerisiou G, Komnos A, Zintzaras E, Scarmeas N, Papadimitriou A, Karantanas A. **IL-1RN and IL-1B gene polymorphisms and cerebral hemorrhagic events after traumatic brain injury.** Neurology. 2005;65(7):1077-82.

4. Ευθύμιος Δαρδιώτης, Κωνσταντίνος Πατεράκης, Μαρία Δαρδιώτη, Κωνσταντίνος Αγγελάκης, Απόστολος Κομνός, Βάνα Τσιμούρτου, Αναστασία Τάσιου, Απόστολος Καραντάνας, Γεώργιος Χατζηγεωργίου. **Συσχέτιση πολυμορφισμών σε γονίδια ιντερλευκινών με την έκβαση ασθενών μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ)**. Ελληνική Νευροχειρουργική 2007, 14(2):59-67.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. G. Hadjigeorgiou, E. Dardiotis, K. Paterakis, M. Dardioti, K. Aggelakis, A. Tasiou, G. Xiromerisiou, A. Karantanas, A. Komnos, E. Zintzaras, N. Scarmeas, A. Papadimitriou: **Association study of (VNTR) IL-1RN and (-511) IL-1B gene polymorphisms and cerebral haemorrhagic events in patients with traumatic brain injury.** Fifteenth Meeting of the European Neurological Society, 18-22 June 2005, Vienna, Austria. Journal of Neurology, Volume 252, Suppl.2, June 2005: II/85.

2. M. Dardioti, E. Dardiotis, K. Aggelakis, A. Tasiou, K. Paterakis, A. Komnos, A. Karantanas, G. Xiromerisiou, A. Papadimitriou and G. Hadjigeorgiou. **A1-antichymotrypsin gene polymorphism and cerebral hemorrhagic events in patients with traumatic brain injury**. 9th Congress of the European Federation of Neurological Societies, Athens, Greece, 17-20 September, 2005. European Journal of Neurology, Volume 12, Supplement 2, September 2005, p278.

3. M. Dardioti, E. Dardiotis, K. Aggelakis, K. Paterakis, A. Komnos, A. Karantanas, A.Tasiou, G. Xiromerissiou, G. Hadjigeorgiou: **Interleukin 2 (+114) gene polymorphism and traumatic brain injury.** Sixteenth Meeting of the European Neurological Society, 27-31 May 2006, Lausanne, Switzerland. Journal of Neurology, Volume 253, Suppl.2, May 2006: II/53.

4. M. Dardioti, E. Dardiotis, K. Aggelakis, A. Komnos, A.Tasiou, K. Paterakis, G. Noulas, A. Papadimitriou, G.M. Hadjigeorgiou: **Interleukin 2 (-384) gene polymorphism and traumatic brain injury.** 2006 EFNS. European Journal of Neurology, Volume 13, Supplement 2, September 2006, p150.

5. E. Dardiotis, M. Dardioti, A. Komnos, K. Paterakis, G. Noulas, G. Xiromerisiou, K. Aggelakis, A.Tasiou, I. Gabranis, S. Ralli, A. Karantanas, A. Papadimitriou, G. Hadjigeorgiou: **Interleukin 6 (-174) gene polymorphism and traumatic brain injury.** Seventeenth Meeting of the European Neurological Society, 16-20 June 2007, Rhodes, Greece. Journal of Neurology, Volume 254, Suppl.3, May 2007: III/71

6. M. Δαρδιώτη, Ε. Δαρδιώτης, Κ. Αγγελάκης, Α. Τάσιου, Γ. Ξηρομερίσιου, Κ. Πατεράκης, Α. Κομνός, Α. Καραντάνας, Α. Παπαδημητρίου, Γ. Χατζηγεωργίου: **Μελέτη πολυμορφισμών ιντερλευκινών και έκβαση μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση**. 20^{ο} Πανελλήνιο συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων. Λάρισα 16-19 Μαρτίου 2006. Περιλήψεις σελ 54-55.

ΒΡΑΒΕΙΑ

Ε. Δαρδιώτης, Κ. Πατεράκης, Μ. Δαρδιώτη, Κ. Αγγελάκης, Α. Κομνός, Β. Τσιμούρτου, Α. Τάσιου, Α. Καραντάνας, Γ. Χατζηγεωργίου: **Μελέτη γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμών σε γονίδια ιντερλευκινών και έκβαση μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση**. 20^{ο} Πανελλήνιο Νευροχειρουργικό συνέδριο (Ελληνική Νευροχειρουργική Εταιρεία), 8-11 Ιουνίου 2006, Χαλκιδική-Πόρτο Καρράς. (Βραβείο Ιωάννης Βάμβας, 1^{ο} βραβείο για την καλύτερη υποβληθείσα εργασία, 5.000€)

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδίας τον κ. Χατζηγεωργίου Γεώργιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας για την επίβλεψη, την καθοδήγηση και τη βοήθειά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης, καθώς και για την ουσιαστική του στήριξη, την προσωπική του μέριμνα και την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλε όλα αυτά τα χρόνια.

Θερμές ευχαριστίες στον κ. Παπαδημητρίου Αλέξανδρο, Καθηγητή Νευρολογίας, και στην κ. Κόλλια Παναγούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής Ανθρώπου για την ουσιαστική συμπαράστασή τους και για την εκτίμηση και αξιολόγηση της εργασίας αυτής.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον κ. Φουντά Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή Νευροχειρουργικής, τον κ. Πατεράκη Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή Νευροχειρουργικής, και τον κ. Κομνό Απόστολο, Διευθυντή της ΜΕΘ του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, για τη βοήθειά τους στη συλλογή περιστατικών με ΚΕΚ.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Νευρολόγο κ. Δαρδιώτη Ευθύμιο, για τη συμπαράστασή του στην διεκπεραίωση της διδακτορικής μου μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου για την ολόψυχη ηθική τους συμπαράσταση στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Στο σύζυγό μου

και στις δύο κόρες μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ) επάγει μια σειρά φλεγμονωδών αντιδράσεων η έκταση των οποίων καθορίζει το βαθμό της οξείας και χρόνιας νέκρωσης των νευρικών κυττάρων και κατ' επέκταση την κλινική εικόνα και έκβαση του ασθενούς. Κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ διαδραματίζουν οι ιντερλευκίνες που είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές της φλεγμονής. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων των ιντερλευκινών στη βαρύτητα, την έκβαση και την παρουσία αιμορραγικών φαινομένων σε ασθενείς με ΚΕΚ. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί της IL-1β(-511C/T, rs16944), IL-1β(+3953C/T, rs1143634), IL-1α(-889C/T, rs1800587), IL-1RA (VNTR στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου, rs2234663), IL-2(+114G/T, rs2069763), IL-2(-384T/G, rs2069762) και της IL-6(-174G/C, rs1800795).

Μέθοδος: Στη μελέτη συλλέχθηκαν προοπτικά 365 ασθενείς με ΚΕΚ (60 γυναίκες [16.4%]). Η αρχική κλινική εικόνα εισόδου των ασθενών εκτιμήθηκε με τη χρήση της κλίμακας κώματος της Γλασκόβης, ενώ η εξάμηνη έκβαση με τη χρήση της κλίμακας έκβασης της Γλασκόβης. Με βάση τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας κατά την εισαγωγή οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την παρουσία και τον τύπο της αιμορραγίας.

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη μέθοδο της εξαλάτωσης, ενώ η ταυτοποίηση των γονοτύπων των πολυμορφισμών έγινε με γνωστές PCR/RFLP μεθόδους.

Η ισορροπία Hardy-Weinberg εξετάσθηκε με τη χρήση του Fisher exact test. Για τη σύγκριση των διαφόρων κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2. Με τη χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης έγινε σταθεροποίηση της γενετικής συσχέτισης κάθε πολυμορφισμού, λαμβάνοντας υπόψη τις επιδράσεις διαφόρων συγχυτικών παραγόντων. Η επίδραση των γονοτύπων και των αλληλομόρφων εξετάσθηκε εφαρμόζοντας το επικρατητικό, το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης και το μοντέλο της αντίθεσης των αλληλομόρφων. Έγινε χαρτογράφηση της ανισορροπίας σύνδεσης και σύγκριση των απλοτύπων με βάση μεθόδους εκτίμησης της μεγίστης πιθανοφάνειας. Λόγω πολλαπλών συγκρίσεων εφαρμόστηκε η διόρθωση κατά Bonferroni: στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με p=0.007 (0.05/7=0.007)

Αποτελέσματα: Δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση από την ανάλυση των πολυμορφισμών της IL-1β(-511C/T), της IL-1β(+3953C/T), της IL-1α(-889C/T), της IL-2 (-384T/G) και της IL-6(-174G/C).

Το αλληλόμορφο T του πολυμορφισμό της IL-2(+114G/T) βρέθηκε ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε

στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα άτομα με GCS 3-8 και στα άτομα με GCS 13-15 με βάση τη σύγκριση των αλληλομόρφων (λόγος πιθανοτήτων [διάστημα εμπιστοσύνης] 0.57 [0.38-0.80], p=0.002) και μια τάση προς συσχέτιση στο επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης (0.53 [0.31-0.81], p=0.009) και στο υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης (2.32 [1.18-5.12], p=0.02).

Από την ανάλυση του πολυμορφισμό της IL-1RA (VNTR) βρέθηκε ότι οι φορείς του αλληλομόρφου 2 έχουν 4.5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση αιμορραγικών φαινομένων μετά από ΚΕΚ (4.57 [1.67-12.96], p=0.004). Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και όταν συγκρίνουμε τις συχνότητες των αλληλομόρφων (0.26 [0.14-0.71], p=0.003). Επίσης, στους φορείς του αλληλομόρφου 2 βρέθηκε ότι υπάρχει μια τάση για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου: σύγκριση GCS εισόδου 3-8 σε σχέση με GCS 9-12 (επικρατητικό μοντέλο 0.32 [0.12-0.90], p=0.030 και μοντέλο αντίθεσης αλληλίων 0.32 [0.16-0.83], p=0.02) και στη σύγκριση GCS εισόδου 3-8 σε σχέση με GCS 13-15 (επικρατητικό μοντέλο 0.37 [0.19-0.78], p=0.02 και μοντέλο σύγκρισης αλληλίων 0.45 [0.25-0.91], p=0.017). Τέλος, όσον αφορά την 6μηνη έκβαση, οι φορείς του αλληλομόρφου 2 είχαν μια τάση για ευνοϊκότερη έκβαση: επικρατητικό μοντέλο 0.39 [0.19-0.89], p=0.011 και μοντέλο σύγκρισης αλληλομόρφων 0.43 [0.19-0.86], p=0.035.

Από την ανάλυση των απλοτύπων για τους πολυμορφισμούς της οικογένειας της IL-1 (IL-1α -889C/T, IL-1β +3953C/T, IL-1β -511C/T, IL-1RA VNTR) ο απλότυπος IV (1-1-2-2) βρέθηκε να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου (0.16 (0.05-0.51), p=0.0005) και αιμορραγικά φαινόμενα (0.40 (0.20-0.78), p=0.0058). Επίσης, ο απλότυπος VIII (2-2-2-1) σχετιζόταν με μεγαλύτερη πιθανότητα για ηπιότερη κλινική εικόνα εισόδου (9.79 (2.74-34.98), $p=2.64*10^{-5}$), ενώ ο απλότυπος VI (2-1-1-1) σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για δυσμενή 6μηνη έκβαση 3.01 [1.59-5.69], p=0.0004). Από την ανάλυση των απλοτύπων για τους πολυμορφισμούς της IL-2 (IL-2 +114G/T και IL-2 -384T/G) βρέθηκε ότι ο απλότυπος II (2-1) σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου (0.55 (0.39-0.78), p=0.00087).

Συμπεράσματα: Με την παρούσα μελέτη φαίνεται ότι μια σειρά γενετικών πολυμορφισμών των ιντερλευκινών επηρεάζουν την κλινική εικόνα εισόδου, την έκβαση και την παρουσία αιμορραγιών στους ασθενείς με ΚΕΚ. Ωστόσο, επιπλέον μελέτες απαιτούνται για την επιβεβαίωση των παραπάνω συσχετίσεων και τη διερεύνηση των υποκείμενων παθογενετικών μηχανισμών.

ABSTRACT

Introduction: Traumatic Brain Injury (TBI) triggers inflammatory processes the extent of which determines the degree of acute and chronic neuronal cell death and patient's clinical outcome. Interleukins, which are the main mediators of inflammation, were found to play a central role in the pathophysiology of TBI. We conducted a prospective study to investigate possible influence of genetic polymorphisms of the interleukin genes in the clinical severity, 6 months outcome and hemorrhagic events in patients with TBI. In particular, we tested the IL-1β(-511C/T, rs16944), IL-1β(+3953C/T, rs1143634), IL-1α(-889C/T, rs1800587), IL-1RA (VNTR, rs2234663), IL-2(+114G/T, rs2069763), IL-2(-384T/G), rs2069762) and IL-6(-174G/C, rs1800795) polymorphisms.

Patient-Methods: 365 (women=60 [16.4%]) prospectively recruited patients with TBI were evaluated. Initial neurological status and six-month outcome were assessed by means of the Glasgow Coma Score and Glasgow Outcome Scale respectively. Based on computed tomography findings at admission patients were stratified according to the presence and type of haemorrhagic event.

DNA was extracted using the salting out method, while SNPs genotypes were determined using standard PCR/RFLP methods

The Hardy–Weinberg equilibrium was assessed by means of the Fisher's exact test. For comparisons between categorical variables we used the χ^2 test. Multivariable logistic regression analysis was used to control for possible confounding factors. Analysis for dominant recessive and allele contrast models of inheritance was performed. Linkage disequilibrium between SNPs was examined and haplotype estimation was performed by an expectation-maximization algorithm. Control for multiple comparisons was performed using Bonferroni's correction for 7 polymorphisms. The level of significance (p) was equal to 0.007 (0.05/7=0.007).

Results: No statistically significant difference was found for IL-1β(-511C/T), IL-1β(+3953C/T), IL-1α(-889C/T), IL-2 (-384T/G) and IL-6(-174G/C) polymorphisms.

Allele T of IL-2(+114G/T) polymorphism was associated with more severe clinical presentation at admission. There was a significant association between patients with GCS 3-8 and those with GCS 13-15 when considering allele contrast model (odds ratios [confidence interval] 0.57 [0.38-0.80], p=0.002) and a trend for association for dominant model (0.53 [0.31-0.81], p=0.009) and recessive model of inheritance (2.32 [1.18-5.12], p=0.02).

Compared to noncarriers, IL-1RA allele 2 carriers had 4.5 times higher odds of having cerebral hemorrhages after TBI (4.57 [1.67-12.96], p=0.004). Similar results

were obtained when comparing allele contrast frequencies (0.26 [0.14-0.71], p=0.003). In allele 2 carriers there was also a trend towards severe clinical presentation at admission: GCS at admission 3-8 vs GCS 9-12 (dominant genetic model 0.32 [0.12-0.90], p=0.030 and allele contrast model 0.32 [0.16-0.83], p=0.02) and GCS at admission 3-8 vs GCS 13-15 (dominant model 0.37 [0.19-0.78], p=0.02 and allele contrast model 0.45 [0.25-0.91], p=0.017). Finally, an opposite trend towards favourable 6 month's outcome was found for IL-1RA allele 2 (dominant model 0.39 [0.19-0.89], p=0.011 and allele contrast genetic model 0.43 [0.19-0.86], p=0.035).

Haplotype analysis of IL-1 SNPs (IL-1α -889C/T, IL-1β +3953C/T, IL-1β -511C/T, IL-1RA VNTR) revealed that haplotype IV (1-1-2-2) was associated with increased risk for more severe clinical presentation at admission [0.16 (0.05-0.51), p=0.0005] and hemorrhagic events [0.40 (0.20-0.78), p=0.0058]. Haplotype VIII (2-2-2-1) was associated with higher likelihood for milder clinical presentation at admission [9.79 (2.74-34.98), $p=2.64*10^{-5}$], while haplotype VI (2-1-1-1) was linked to unfavourable 6month outcome [3.01 (1.59-5.69), p=0.0004]. Haplotype analysis of IL-2 SNPs (IL-2 +114G/T, IL-2 -384T/G) revealed that haplotype II (2-1) was associated with increased risk for more severe clinical presentation at admission [0.55 (0.39-0.78), p=0.00087].

Conclusions: Our study provides evidence of an implication of interleukins genetic polymorphisms in the clinical presentation at admission, 6 months outcome and hemorrhagic events of TBI patients. However, further studies are needed to confirm these associations and investigate underlying pathogenetic mechanisms.

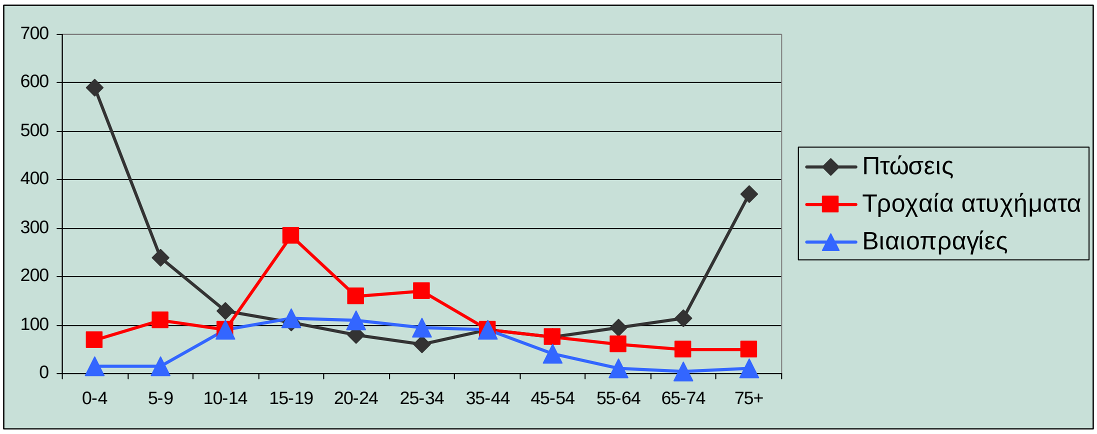
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΡΑΝΙΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΚΑΚΩΣΗ (ΚΕΚ)

Εισαγωγή

Ανάμεσα στην τεράστια ποικιλία των νευρολογικών νοσημάτων, η κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ) κατέχει υψηλή θέση σε συχνότητα και βαρύτητα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπου υπάρχουν επίσημα στατιστικά στοιχεία, 500.000 Αμερικάνοι με εγκεφαλικό τραύμα εισάγονται στα νοσοκομεία κάθε χρόνο, οι περισσότεροι από τους οποίους είναι νέοι και κατά τα άλλα υγιείς,. Από αυτούς 75.000 με 90.000 καταλήγουν, ενώ ακόμη μεγαλύτερος είναι ο αριθμός αυτών που παρουσιάζουν μόνιμη αναπηρία. Από τους παραπάνω δείκτες διαφαίνεται ότι το εγκεφαλικό τραύμα αποτελεί διεθνώς σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας [1].

Στην Ελλάδα, κάθε χρόνο, περίπου 35.000 άτομα εισάγονται στα Νοσοκομεία με σοβαρές ΚΕΚ. Υπολογίζεται ότι, οι 1.600 ασθενείς από αυτούς πεθαίνουν. Στη χώρα μας επίσης οι βαριές ΚΕΚ εξαιτίας τροχαίων ατυχημάτων κατατάσσονται στις πρώτες αιτίες θανάτου και μόνιμης αναπηρίας σε όλες τις ηλικίες και αποτελούν την πρώτη αιτία με διαφορά στις νέες ηλικίες, ιδίως από 19 έως 25 ετών. Το πρόβλημα πιθανότατα είναι μεγαλύτερο στη χώρα μας αν αναλογιστούμε τη συμφόρηση γενικότερα που υπάρχει στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συχνότερες αιτίες ΚΕΚ σε σχέση με την ηλικία. Στις μικρότερες και μεγαλύτερες ηλικίες κυριαρχούν οι ΚΕΚ λόγω πτώσης, ενώ τα τροχαία ατυχήματα είναι περισσότερο αυξημένα στις ηλικίες 15-30.



Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με ΚΕΚ χρειάζονται ιατρική φροντίδα και ο γιατρός θα πρέπει να είναι προετοιμασμένος για την έγκαιρη διάγνωση των διάφορων τύπων της και την αντιμετώπισή της τόσο στον τόπο του ατυχήματος όσο και στο νοσοκομείο.

Οι περισσότερες ΚΕΚ που συμβαίνουν στην καθημερινή ζωή είναι κλειστές (μη διατιτραίνουσες). Οι ανοιχτές κακώσεις συμβαίνουν συνήθως μετά από πυροβολισμό.

Ο όρος εγκεφαλική διάσειση (concussion) συνιστά μια παροδική λειτουργική εγκεφαλική βλάβη, η οποία προκαλείται μετά από βίαιο χτύπημα ή τράνταγμα του εγκεφάλου και εκδηλώνεται ως παροδική απώλεια των αισθήσεων. Ο όρος εγκεφαλική θλάση (contusion) αναφέρεται σε εστιακή εγκεφαλική βλάβη και οφείλεται στη δημιουργία μώλωπα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα.

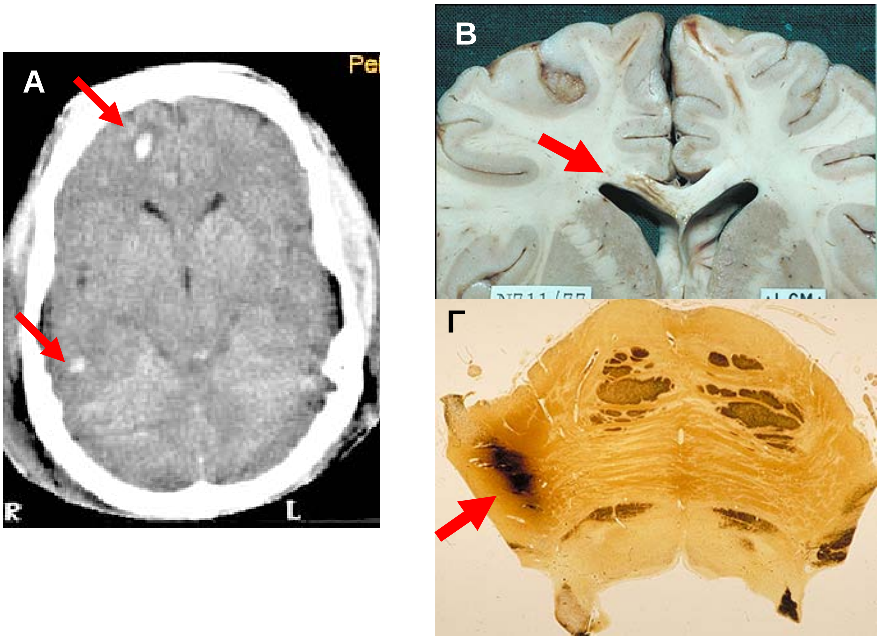
Εάν η βλάβη εντοπίζεται κάτω από το σημείο της πρόσκρουσης ονομάζεται coup κάκωση, ενώ αν βρίσκεται στο εντελώς αντιδιαμετρικό σημείο ονομάζεται contracoup [2]. Η εγκεφαλική θλάση συνιστάται από μια μεγάλη ποικιλία παθολογικών αλλοιώσεων όπως τοπικό οίδημα, πετεχειώδης εξαγγείωση αίματος ή μεγαλύτερη αιμορραγική διήθηση, διάσχιση νευρικών ινών (shearing injury), και φλεγμονή. Όλες οι παραπάνω αλλοιώσεις της εγκεφαλικής θλάσης προκαλούν σχεδόν πάντα παροδική ή πιο επίμονη διαταραχή του επιπέδου συνείδησης του ασθενούς.

Μηχανισμοί εγκεφαλικής κάκωσης

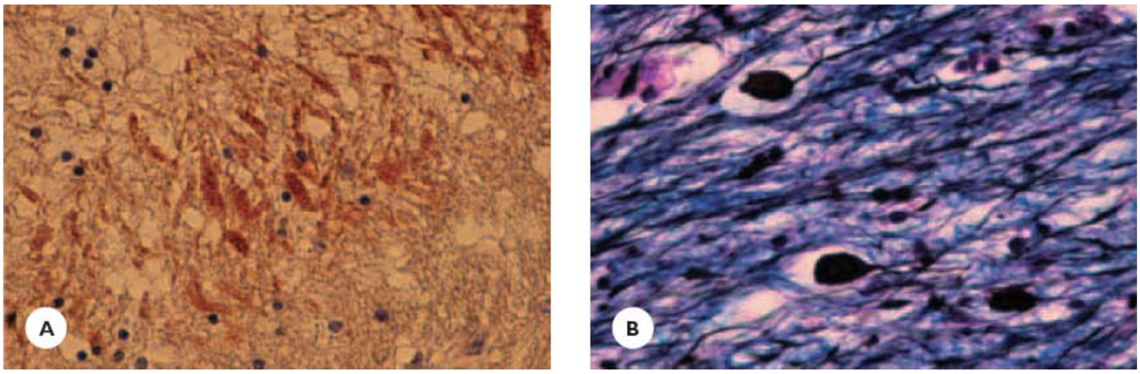
Είναι γνωστό ότι ο εγκέφαλος στην πραγματικότητα επιπλέει μέσα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ). Το γεγονός αυτό του δίνει τη δυνατότητα χωριστής κίνησης απ' αυτήν του κρανίου. Μετά από ένα έντονο-γρήγορο χτύπημα, το οποίο θέτει σε κίνηση την κεφαλή (κάκωση επιτάχυνσης), η κίνηση του εγκεφάλου καθυστερεί. Επίσης, όταν η κεφαλή έχει μια ταχύτητα και χτυπήσει σε ακίνητο αντικείμενο (κάκωση επιβράδυνσης), η κίνηση της κεφαλής σταματά απότομα, γεγονός που δε συμβαίνει με τον εγκέφαλο. Πρέπει ακόμη να σημειωθεί ότι το στέλεχος που βρίσκεται στον οπίσθιο κρανιακό βόθρο, και ειδικότερα κάτω από το σκηνίδιο της παρεγκεφαλίδας, έχει μικρή δυνατότητα κίνησης. Έτσι, σε εγκεφαλικές κακώσεις, λόγω της μεγαλύτερης μετακίνησης των εγκεφαλικών ημισφαιρίων σε σχέση με το εγκεφαλικό στέλεχος, το τελευταίο και μάλιστα στο επίπεδο του άνω δικτυωτού σχηματισμού υφίσταται μέγιστη παραμόρφωση. Αυτή είναι η πιο πιθανή εξήγηση της παροδικής απώλειας συνείδησης (διάσειση) που συμβαίνει μόνο όταν η κεφαλή είναι κινούμενη τη στιγμή της κάκωσης.

Όσον αφορά τώρα τις εγκεφαλικές θλάσεις, ο μηχανισμός είναι παρόμοιος. Πιο συγκεκριμένα, μετά την πρόσκρουση οι επιφανειακές εγκεφαλικές έλικες μπορούν να τραυματιστούν από τις οστικές προεξοχές της εσωτερικής επιφάνειας του κρανίου ή τις αναδιπλώσεις της σκληράς μήνιγγας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία coup ή contracoup θλάσεων, αιμορραγιών ή διασχίσεων των παρακείμενων νευρικών ινών.

Μερικές φορές λόγω της πρόσκρουσης του εγκεφάλου, της σύνθλιψης και της παραμόρφωσης καθώς και των δυνάμεων που αναπτύσσονται, οι θλάσεις μπορεί να βρίσκονται μακριά από το σημείο της πλήξης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάσχιση ή ρήξη των αξόνων των νευρικών ινών στη λευκή ουσία των ημισφαιρίων, το μεσολόβιο ή το στέλεχος (αξονότμηση τύπου I, II και III αντίστοιχα) [3].



Εικόνα: Διάχυτη αξονική βλάβη τύπου I (A), τύπου II (B) και τύπου III (Γ).



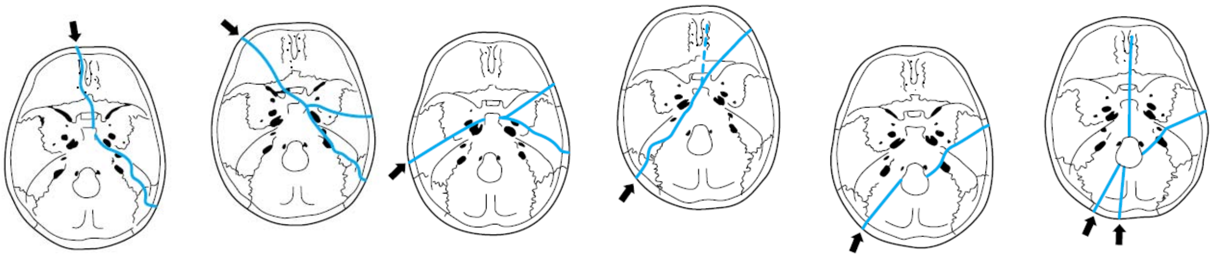
Εικόνα: Ιστοπαθολογική εικόνα διάχυτης αξονικής βλάβης τύπου II, όπου αναγνωρίζεται βλάβη των αξόνων με θετική χρώση για το πρόδρομο μόριο του β-αμυλοειδούς (A), και αξονικά σφαιροειδή (B).

Επίσης, βλήματα με υψηλή ταχύτητα μπορούν να διαπεράσουν το κρανίο και την κρανιακή κοιλότητα, ή σπανιότερα, το κρανίο μπορεί να συμπιεστεί μεταξύ δύο συγκλινόντων δυνάμεων που συνθλίβουν τον εγκέφαλο, χωρίς όμως να προκαλούν σημαντική μετατόπιση της κεφαλής ή του εγκεφάλου. Στις περιπτώσεις αυτές, ο ασθενής μπορεί να υποστεί σοβαρό ή θανατηφόρο τραυματισμό, χωρίς όμως άμεση απώλεια συνείδησης. Οι κυριότερες βλάβες που προκαλούνται από τραύματα τέτοιου τύπου είναι η αιμορραγία και η καταστροφή του εγκεφαλικού ιστού. Συχνή σε τέτοιες περιπτώσεις είναι η εμφάνιση λοίμωξης, όπως μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλικά αποστήματα.

Κατάγματα κρανίου

Η βαρύτητα της εγκεφαλικής κάκωσης σχετίζεται αδρά με την παρουσία καταγμάτων του κρανίου. Για παράδειγμα, μια φαινομενικά μικρή κάκωση μπορεί να προκαλέσει κάταγμα στο κροταφικό οστό και ρήξη της μέσης μηνιγγικής αρτηρίας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία επισκληρίδιου αιματώματος. Ωστόσο, μπορεί να υπάρξει βαριά διάσειση και θλάση χωρίς κάταγμα κρανίου.

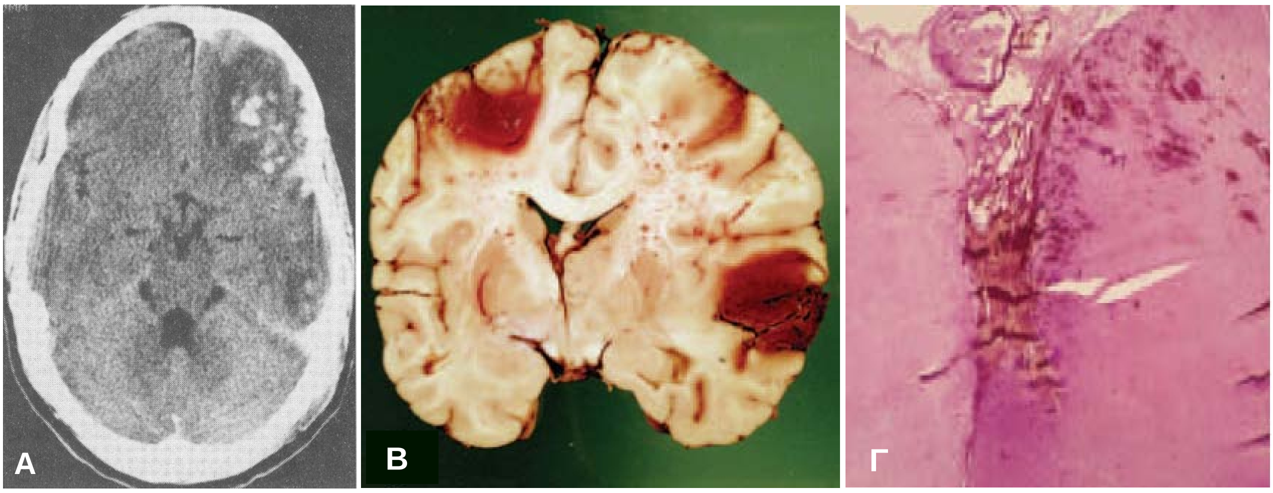
Είναι γεγονός ότι πολλές φορές η ενέργεια μιας κάκωσης μπορεί να αποσβένεται με ένα κάταγμα, με αποτέλεσμα να μη μεταδίδεται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Κατάγματα που απαιτούν προσοχή είναι αυτά της βάσης του κρανίου, γιατί μπορεί να προκληθεί κάκωση του οπτικού νεύρου ή των άλλων κρανιακών νεύρων και να επιτραπεί η είσοδος αέρα (πνευμο-εγκέφαλος) και μικροβίων ή η εκροή ΕΝΥ από τους παραρρίνιους κόλπους και τον έξω ακουστικό πόρο (ρινόρροια, ωτόρροια αντίστοιχα). Ένα κάταγμα στο σφηνοειδές οστούν ή στην περιοχή του τουρκικού εφιππίου μπορεί να προκαλέσει διάσχιση της καρωτίδας (με αποτέλεσμα τη δημιουργία καρωτιδο-σηραγγώδη συριγγίου) ή διατομή των μίσχων της υπόφυσης (με αποτέλεσμα την εμφάνιση άποιου διαβήτη, ανικανότητας και αμηνόρροιας).



Εικόνα: Κατάγματα της βάσης του κρανίου ανάλογα με το σημείο και την κατεύθυνση της κάκωσης

Διάσειση και θλάση

Μια κλειστή ΚΕΚ μπορεί να συνοδεύεται με απώλεια της συνείδησης, η διάρκεια της οποίας ποικίλει. Όσο πιο μεγάλη είναι η διάρκεια της απώλειας συνείδησης τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα στην εγκεφαλική διάσειση να επιπροστίθονται εγκεφαλικές θλάσεις, αιμορραγία, εντοπισμένο οίδημα, αξονότμηση. Αυτές οι αλλοιώσεις είναι υπεύθυνες και για την εμφάνιση συμπτωμάτων, όπως ημιπάρεση, αφασία, ή άλλα εστιακά συμπτώματα, ενώ σε βαριές περιπτώσεις μπορεί να υπάρχουν σημεία μετατόπισης της μέσης γραμμής του εγκεφάλου, ή εγκολεασμού της αγκιστρωτής έλικας του κροταφικού λοβού στο σκηνίδιο της παρεγκεφαλίδας.



Εικόνα: : Εικόνες πολλαπλών τραυματικών αιμορραγικών θλάσεων (Α, Β, Γ)

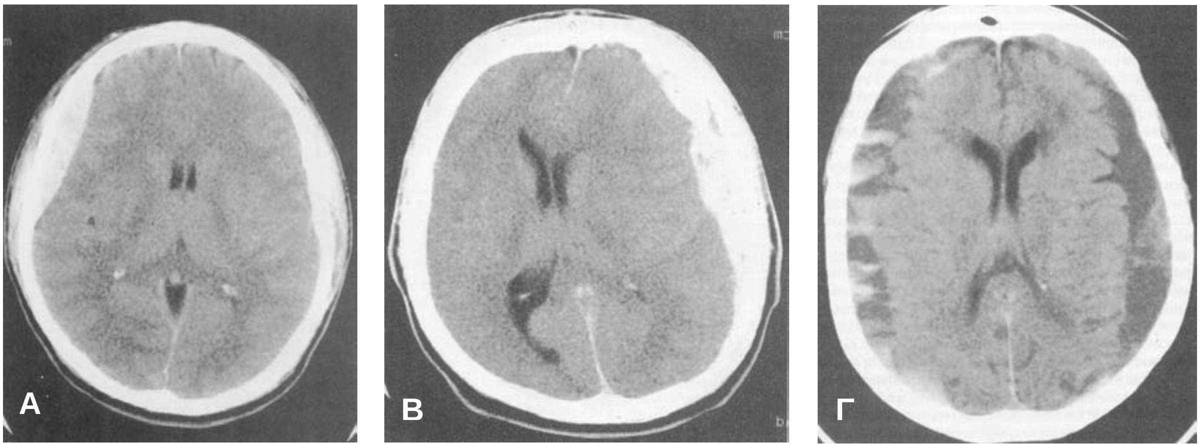
Οξύ επισκληρίδιο αιμάτωμα

Η κατάσταση αυτή οφείλεται κατά κανόνα σε κάταγμα του κροταφικού ή βρεγματικού οστού με συνοδό ρήξη της μέσης μηνιγγικής αρτηρίας (ή μερικές φορές της φλέβας). Σπανιότερα, υπάρχει ρήξη φλεβώδους κόλπου. Η χαρακτηριστική κλινική εικόνα είναι ότι ενώ ο ασθενής έχει συνείδηση, όσο περνά η ώρα και το αιμάτωμα μεγαλώνει αυτός καθίσταται ημιπληγικός και κωματώδης. Η αξονική τομογραφία του εγκεφάλου είναι διαγνωστική και αποκαλύπτει ένα φακοειδούς σχήματος αιμάτωμα με λεία έσω επιφάνεια. Στις περισσότερες περιπτώσεις, κρίνεται απαραίτητη η χειρουργική επέμβαση και η παροχέτευση του αιματώματος.

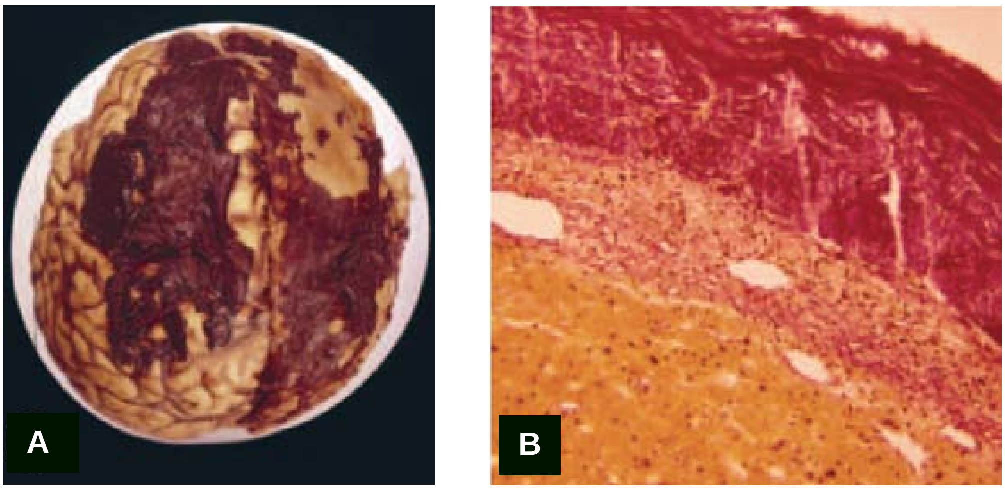
Οξύ και χρόνιο υποσκληρίδιο αιμάτωμα

Το οξύ υποσκληρίδιο αιμάτωμα προκαλείται από ρήξη φλεβών που γεφυρώνουν την περιοχή μεταξύ σκληράς μήνιγγας και εγκεφάλου [4]. Στο οξύ υποσκληρίδιο αιμάτωμα, ετερόπλευρο ή αμφοτερόπλευρο, υπάρχει ενίοτε ένα σύντομο «φωτεινό» διάλειμμα, μεταξύ της κάκωσης της κεφαλής και της εγκατάστασης του κώματος. Πιο συχνά όμως το κώμα εμφανίζεται αμέσως και επιδεινώνεται προοδευτικά. Αρκετά συχνά το οξύ υποσκληρίδιο αιμάτωμα συνδυάζεται με επισκληρίδια αιμορραγία και εγκεφαλική θλάση ή ρήξη. Ευμεγέθη οξέα υποσκληρίδια αιματώματα προκαλούν παρεκτόπιση της επίφυσης και συμπίεση της πλάγιας κοιλίας. Στις περιπτώσεις αμφοτερόπλευρων αιματωμάτων μπορεί να μην υπάρχει παρεκτόπιση και το κοιλιακό σύστημα να απεικονίζεται συμμετρικό.

Οξέα, ταχέως επεκτεινόμενα υποσκληρίδια αιματώματα οφείλονται σε ρήξη φλεβών και τα συμπτώματα, όπως κεφαλαλγία, σύγχυση, σπασμοί ή κώμα, οφείλονται σε συμπίεση του εγκεφαλικού παρεγχύματος, είτε από το διογκούμενο θρόμβο, είτε από το διαρρέον αίμα. Σε αντίθεση με τα επισκληρίδια αρτηριακά αιματώματα, τα οποία συνεχώς διογκώνονται, η φλεβική υποσκληρίδια αιμορραγία συνήθως σταματά λόγω της αύξησης της ενδοκράνιας πίεσης και έτσι μπορεί να μεταπέσει σε χρονιότητα.



Εικόνα: Οξύ επισκληρίδιο αιμάτωμα στο Δε ημισφαίριο (Α), οξύ υποσκληρίδιο αιμάτωμα στο Αρ ημισφαίριο με σημαντική παρεκτόπιση της μέσης γραμμής (Β) και χρόνια υποσκληρίδια αιματώματα και στα δύο ημισφαίρια (Γ).



Εικόνα: Οξύ υποσκληρίδιο αιμάτωμα (Α) και ανάπτυξη κοκκιωματώδους ιστού περί την κάψα χρονίου υποσκληριδίου αιματώματος (Β).

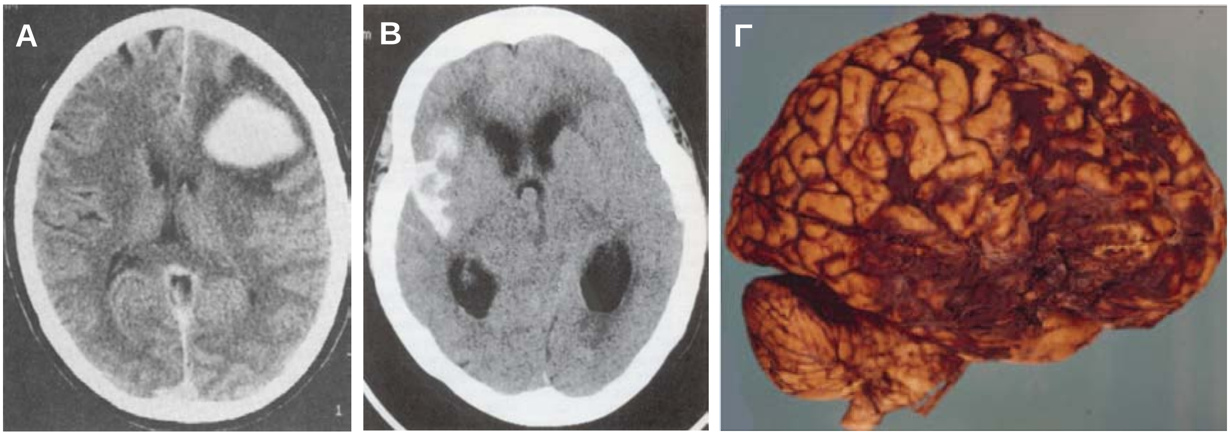
Οι πλέον αξιόπιστες διαγνωστικές εξετάσεις είναι η αξονική τομογραφία με έγχυση σκιαγραφικού και η μαγνητική τομογραφία. Στην αξονική τομογραφία, το αιμάτωμα απεικονίζεται αρχικά υπέρπυκνο, για να γίνει στη συνέχεια ισόπυκνο, γεγονός που μπορεί να καταστήσει δύσκολη την ταυτοποίησή του, με εξαίρεση τις περιπτώσεις που προκαλεί παρεκτόπιση του εγκεφαλικού ιστού. Με τη χορήγηση σκιαγραφικού και οι δύο απεικονιστικές μέθοδοι συνήθως αποκαλύπτουν τα όρια του αιματώματος.

Στις περισσότερες περιπτώσεις οξείας υποσκληρίδιας αιμορραγίας αρκεί η αφαίρεση του αιματώματος με κρανιοανάτρηση, πριν ο ασθενής πέσει σε κώμα. Η αντιμετώπιση μεγαλύτερων αιματωμάτων απαιτεί ευρεία κρανιεκτομή που επιτρέπει τον έλεγχο της αιμορραγίας και την αφαίρεση του οργανωμένου αιματώματος.

Υπαραχνοειδής-Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία

Όταν το εγκεφαλικό παρέγχυμα υποστεί θλάσεις σχεδόν πάντα αναγνωρίζεται κάποιου βαθμού υπαραχνοειδής αιμορραγία και όχι σπάνια υποσκληρίδια αιμορραγία. Η υπαραχνοειδής αιμορραγία είναι αποτέλεσμα τραυματικής ρήξης αγγείων μέσα στον υπαραχνοειδή χώρο. Ο άρρωστος παρουσιάζει αυχενική δυσκαμψία, διαταραχή του επιπέδου συνείδησης και άλλοτε άλλου βαθμού εστιακή σημειολογία. Οι παραπάνω βλάβες απεικονίζονται εύκολα με αξονική τομογραφία.

Όταν η αιμορραγία εντοπίζεται μέσα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα ονομάζεται ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και προκαλείται από τη ρήξη μικρών τροφικών αγγείων ή μεγαλύτερων αγγειακών κλάδων.



Εικόνα: Τραυματική ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (Α) και μετατραυματική υπαραχνοειδής αιμορραγία (Β, Γ)

Η κρανιεκτομή και η αφαίρεση του αιματώματος έχει αποδειχθεί επιτυχής σε ορισμένες περιπτώσεις. Η ένδειξη χειρουργικής επέμβασης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι το επίπεδο συνείδησης, ο χρόνος που έχει παρέλθει από τον τραυματισμό, η έκταση και ο τύπος της εγκεφαλικής βλάβης, όπως αυτή απεικονίζεται στην αξονική τομογραφία.

Συνέπειες της κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης

Η διάσειση σχεδόν πάντα επιφέρει στον ασθενή άλλοτε άλλης διάρκειας περιτραυματική αμνησία, η οποία περιλαμβάνει γεγονότα πριν και μετά την κάκωση. Ιδιαίτερα το τελευταίο αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της βαρύτητας της διάσεισης.

Η διάσειση και μερικές φορές ακόμα και πιο ασήμαντες κακώσεις μπορούν να αφήσουν στον ασθενή επίμονη κεφαλαλγία, καταβολή, ευερεθιστότητα, αίσθημα ζάλης, δυσκολία συγκέντρωσης, διαταραχή του ύπνου, άγχος και κατάθλιψη. Το σύνδρομο αυτό είναι σχετικά συχνό και έχει λάβει ποικίλα ονόματα. Τα συμπτώματα αυτά μπορεί να επιμένουν για εβδομάδες, μήνες ή και χρόνια. Το σύνδρομο είναι πιο συχνό και παρατεταμένο όταν εμπλέκονται νομικά ζητήματα και περιπτώσεις αποζημίωσης. Έτσι, πολύ σημαντικό για την αποκατάσταση του ασθενούς είναι η τακτοποίηση του νομικού προβλήματος και η καθησύχαση του ασθενούς.

Στους ασθενείς με εγκεφαλική θλάση μπορεί να επακολουθήσουν αιμορραγικές ή ισχαιμικές κακώσεις ποικίλης έκτασης και βαρύτητας. Ο θάνατος τις πρώτες ώρες ή ημέρες μετά την ΚΕΚ ή η φυτική κατάσταση είναι συχνά επακόλουθα. Μερικοί ασθενείς μετά από μια παρατεταμένη περίοδο κώματος διατηρούν φυσιολογικά ζωτικά σημεία, ανοίγουν τα μάτια τους, αλλά δεν παρουσιάζουν σημάδια αντίδρασης ή κατανόησης (άγρυπνο κώμα). Σε άλλους ασθενείς, μετά από σοβαρή ΚΕΚ, μπορεί να παραμείνει βαριά αναπηρία με αποτέλεσμα την εξάρτηση από το οικογενειακό περιβάλλον για τις καθημερινές ανάγκες.

Καθυστερημένη εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων [5, 6] μπορεί να εκδηλωθεί σε ποσοστό 10-40% των ασθενών με εγκεφαλικές θλάσεις. Εστιακά ελλείμματα (ημιπάρεση, δυσφασία, διαταραχές μετωπιαίου λοβού, παρεγκεφαλιδική αταξία) μπορούν να επιμείνουν σε ήπια ένταση σε ασθενείς με εγκεφαλικές κακώσεις. Διαταραχές προσωπικότητας και ήπια έκπτωση νοητικής λειτουργίας μπορούν να εκδηλωθούν με την πάροδο του χρόνου και να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στη συνέχιση της εργασίας και την κοινωνική προσαρμογή.

Θεραπεία

Ασθενείς μόνο με παροδική απώλεια της συνείδησης

Ασθενείς με μια μη-επιπλεγμένη διάσειση, οι οποίοι έχουν ήδη ανακτήσει τη συνείδησή τους όταν φτάνουν στο νοσοκομείο, έχουν ελάχιστες δυσκολίες στη θεραπευτική αντιμετώπιση. Πρέπει να τεθούν υπό παρακολούθηση για πιθανές όψιμες επιπλοκές (υποσκληρίδιο και επισκληρίδιο αιμάτωμα, ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και οίδημα).

Ασθενείς, οι οποίοι αναρρώνουν αλλά έχουν επίμονα συμπτώματα κεφαλαλγίας, ζάλης και νευρικότητας (σύνδρομο μετατραυματικής νευρικής αστάθειας), είναι πιο δύσκολο να αντιμετωπιστούν. Σε μερικούς η κάκωση μπορεί να προκαλέσει ανησυχία και κατάθλιψη. Ασθενείς, οι οποίοι έχουν νευρωτική ή καταθλιπτική προσωπικότητα, δύσκολα προσαρμόζονται μετά την κάκωση και ανακτούν την προηγούμενη κοινωνική λειτουργικότητα. Τέλος, ασθενείς, οι οποίοι έχουν υποστεί σοβαρότερη κάκωση, μπορεί να εμφανίσουν μεταβολές στην προσωπικότητά τους και ήπιες διαταραχές γνωσιακών λειτουργιών, όπως τραυματική ψύχωση ή άνοια.

Ασθενείς με βαριά κρανιοεγκεφαλική κάκωση

Σε έναν αναίσθητο ασθενή στον τόπο του ατυχήματος απαιτείται γρήγορη εκτίμηση της κατάστασής του πριν αυτός μετακινηθεί. Αρχικά, θα πρέπει να διαπιστωθεί εάν ο ασθενής αναπνέει, εάν έχει βατή αεροφόρο οδό, ικανοποιητικό σφυγμό και αρτηριακή πίεση, και αν υπάρχει επικίνδυνη αιμορραγία από τραύμα στο τριχωτό της κεφαλής ή σε εσωτερικό όργανο. Μεγάλης βαρύτητας ΚΕΚ μπορεί να προκαλέσουν αναστολή της αναπνοής και ακολούθως διακοπή της καρδιακής λειτουργίας. Τραύματα τέτοιου μεγέθους είναι συχνά θανατηφόρα. Η πιθανότητα συνύπαρξης ΚΕΚ με κάκωση της αυχενικής μοίρας της σπονδυλικής στήλης απαιτεί να ληφθούν οι απαραίτητες προφυλάξεις και να τοποθετηθεί αυχενικός κηδεμόνας κατά τη μετακίνηση του ασθενούς, έτσι ώστε να αποφευχθεί η διατομή του νωτιαίου μυελού.

Στο νοσοκομείο το πρώτο βήμα είναι ο καθαρισμός των αεροφόρων οδών και η εξασφάλιση επαρκούς αερισμού μέσω ενδοτραχειακής διασωλήνωσης όταν αυτό είναι απαραίτητο. Μια προσεκτική έρευνα για άλλα τραύματα θα πρέπει να πραγματοποιηθεί, ιδιαίτερα στην κοιλιά, το θώρακα, την σπονδυλική στήλη και τα μακρά οστά. Η επίμονη υπόταση και η ταχυκαρδία πρέπει να εγείρουν την υποψία ρήξης εσωτερικού οργάνου ή ύπαρξης εσωτερικής αιμορραγίας εντός της θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας. Μερικές φορές, εκτεταμένα κατάγματα ή τραύματα της σπονδυλικής στήλης μπορούν επίσης να προκαλέσουν εκτεταμένη αιμορραγία και υπόταση. Αξιοσημείωτο είναι ότι η πρώιμη και επίμονη υπόταση (συστολική πίεση <90mm Hg) έχει συσχετιστεί με διπλάσια θνητότητα. Γι' αυτό, κύριο μέλημα είναι η αποκατάσταση του ενδοαγγειακού όγκου, η παρακολούθηση των ζωτικών σημείων και η διερεύνηση για την ανακάλυψη του σημείου της αιμορραγίας.

Επίσης, η υπέρταση αποτελεί ένα συνηθισμένο εύρημα μετά από βαριά κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Αρχικά, θα πρέπει να χορηγηθεί φυσιολογικός ορός και να αποφευχθεί η χορήγηση ύδατος, η οποία επιτείνει το εγκεφαλικό οίδημα.

Μόλις σταθεροποιηθούν τα ζωτικά σημεία, θα πρέπει ο ασθενής να υποβληθεί σε μια γρήγορη νευρολογική εξέταση με έμφαση στο βάθος του κώματος, το μέγεθος της κόρης και την αντίδρασή της στο φως, τις οφθαλμικές κινήσεις, το αντανακλαστικό του κερατοειδούς, τις κινήσεις του προσώπου κατά τον μορφασμό, την κατάποση, την άρθρωση, το φαρυγγικό αντανακλαστικό, το μυϊκό τόνο και τις κινήσεις των μελών, τη στάση του σώματος, την αντίδραση στον πόνο και τις τενόντιες αντανακλάσεις.

Μώλωπες στην κροταφική ή οπισθοωτιαία περιοχή (σημείο Battle), ρινική ή ωτική αιμορραγία και εκτεταμένη αιμορραγία και οίδημα του επιπεφυκότος υποδηλώνουν υποκείμενο κάταγμα της βάσης του κρανίου, εκτός των περιπτώσεων ρήξης τύμπανου ή ρινικού τραυματισμού, που επίσης μπορεί να προκαλέσουν αιμορραγία. Τα κατάγματα του οφθαλμικού κόγχου προκαλούν μετάθεση του οφθαλμού με επακόλουθο στραβισμό. Τέλος, κάταγμα της κάτω σιαγόνας προκαλεί κακή σύγκλειση και δυσχέρεια κατά τη διάνοιξη του στόματος. Εάν υπάρχει κατακράτηση ούρων και διάταση της κύστης απαιτείται η τοποθέτηση ουροκαθετήρα. Η θερμοκρασία, οι σφύξεις, η αναπνοή, η αρτηριακή πίεση και το επίπεδο συνείδησης ελέγχονται και καταγράφονται ανά ώρα.

Στη συνέχεια ο ασθενής θα πρέπει να υποβληθεί σε ακτινογραφίες σπονδυλικής στήλης και αξονική τομογραφία εγκεφάλου. Στην περίπτωση που οι ακτινογραφίες είναι αρνητικές, δεν υφίσταται λόγος περαιτέρω ακινητοποίησης του αυχένα. Η διενέργεια της αξονικής τομογραφίας είναι κεντρικής σημασίας στην ΚΕΚ. Η ύπαρξη ευμεγέθους υποσκληριδίου, επισκληριδίου αιματώματος ή ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας αποτελεί ένδειξη για άμεση χειρουργική αποσυμπίεση. Η παρουσία θλάσεων, εγκεφαλικού οιδήματος, παρεκτόπισης των δομών της μέσης γραμμής καθιστά απαραίτητη τη συνεχή παρακολούθηση της εξέλιξής τους, καθώς και τη διαρκή παρακολούθηση και ρύθμιση της ενδοκράνιας πίεσης σε μονάδα εντατικής θεραπείας.

Η κλίμακα κώματος της Γλασκόβης (GCS: Glasgow Coma Scale) είναι ένα πρακτικό μέσο για την εκτίμηση του επιπέδου συνείδησης του ασθενούς ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Ωστόσο, δεν μπορεί να υποκαταστήσει την πλήρη νευρολογική εξέταση. Με την κλίμακα αυτή εκτιμάται η ικανότητα του ασθενούς να εκτελέσει 3 νευρολογικές δοκιμασίες: (1) άνοιγμα των οφθαλμών (αυθόρμητο, μετά από παραγγελία, μετά από επώδυνο ερέθισμα, χωρίς αντίδραση), (2) λεκτική αντίδραση (προσανατολισμένος, συγκεχυμένος, άσχετες λέξεις, ήχοι-βογκητά, χωρίς αντίδραση), (3) κινητική αντίδραση (υπακούει, εντοπίζει το επώδυνο ερέθισμα, αποσύρει, ανώμαλη καμπτική αντίδραση, ανώμαλη εκτατική αντίδραση, χωρίς αντίδραση). Οι τιμές που προκύπτουν από την εφαρμογή της κλίμακας αυτής έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται τόσο με την παρακολούθηση της κλινικής πορείας των ασθενών όσο και με την έκβαση μετά από βαριά κάκωση (GCS<8: σχετίζεται με κακή πρόγνωση). Εάν το άθροισμα σταδιακά μειώνεται, απαιτείται τροποποίηση της θεραπείας.

Κλίμακα κώματος Γλασκόβης (GCS)		
Άνοιγμα ματιών	Αυθόρμητα	4
	Σε πρόσταγμα	3
	Σε πόνο	2
	Καμιά αντίδραση	1
Αντίδραση στο λόγο	Προσανατολισμένος	5
	Συγκεχυμένος	4
	Μόνο λέξεις, φωνές	3
	Ήχοι, βογκητά	2
	Καμιά αντίδραση	1
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

Πίνακας: Η κλίμακα κώματος της Γλασκόβης χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της βαρύτητας του κώματος. Μπορεί να λάβει τιμές από 3 (καμιά αντίδραση) έως 15.

Χειρουργική αντιμετώπιση

Η ανάγκη χειρουργικής παρέμβασης κατά την οξεία μετατραυματική περίοδο καθορίζεται από δύο παράγοντες: την κλινική εικόνα του ασθενούς και την αξονική τομογραφία. Η παρουσία υποσκληρίδιου ή επισκληρίδιου αιματώματος που προκαλεί παρεκτόπιση των δομών της μέσης γραμμής απαιτεί άμεση επέμβαση.

Η χειρουργική επέμβαση πρέπει να επιχειρηθεί πριν εμφανιστούν συμπτώματα λόγω πίεσης του στελέχους, όπως απεγκεφαλισμός, αποφλοίωση, υπέρταση ή βραδυκαρδία, ώστε να αποφευχθεί βλάβη του στελέχους και σοβαρή υπολειμματική αναπηρία.

Προγνωστικοί παράγοντες κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης

Η κλίμακα έκβασης της Γλασκόβης είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών χειρισμών μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση.

Κλίμακα έκβασης Γλασκόβης (GOS)
Πλήρης ανάρρωση (G): Επάνοδος στις φυσιολογικές δραστηριότητες αν και ίσως να υπάρχουν ήπια σωματικά ή ψυχολογικά ελλείμματα.
Μέτρια ανικανότητα (MD): (με ανικανότητα αλλά ανεξάρτητος). Ο ασθενής είναι ανεξάρτητος όσον αφορά την καθημερινή ζωή. Η ανικανότητα μπορεί να συμπεριλαμβάνει ποικίλους βαθμούς από δυσφαγία, ημιπάρεση, αταξία, ελλείμματα μνήμης ή διανοητικά ή αλλαγές της προσωπικότητας.
Σοβαρή ανικανότητα (SD):(με συνείδηση αλλά ανίκανος). Ο ασθενής εξαρτάται από άλλους για καθημερινή φροντίδα και στήριξη εξαιτίας σωματικής ή πνευματικής ανικανότητας.
Φυτική κατάσταση (V): ο ασθενής δεν επιδεικνύει φανερή φλοιϊκή λειτουργία.
Θάνατος (D)

Πίνακας: Η Κλίμακα έκβασης της Γλασκόβης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της αυτονομίας του ασθενούς συνήθως 6 μήνες μετά την ΚΕΚ.

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, οι υπομονάδες της κλίμακας περιλαμβάνουν το θάνατο, την παρατεταμένη φυτική κατάσταση, τη σοβαρή ανικανότητα (ο ασθενής εξαρτάται από τους άλλους για τις δραστηριότητες της καθημερινής ζωής), τη μέτρια ανικανότητα (ο ασθενής είναι ανεξάρτητος στις καθημερινές δραστηριότητες) και την πλήρη ανάρρωση (ο ασθενής επανέρχεται στην εργασία του). Σε μια εργασία του Becker και συν. [7], η οποία είναι αντιπροσωπευτική επιθετικής χειρουργικής θεραπείας, τα αποτελέσματα έχουν ως εξής: θνητότητα: 32%, σοβαρή ανικανότητα/φυτική κατάσταση: 11%, μέτρια ανικανότητα/πλήρης ανάρρωση: 57%. Όλοι οι ασθενείς ήταν κωματώδεις κατά την εισαγωγή.

Μια ποικιλία επιβαρυντικών παραγόντων που υπάρχουν πριν την κάκωση μπορούν να επηρεάσουν την πρόγνωση του σοβαρού εγκεφαλικού τραύματος. Η ηλικία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας και φαίνεται ότι η θνησιμότητα μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση αυξάνεται στις προχωρημένες ηλικίες. Αυτό οφείλεται κυρίως στην υψηλή συχνότητα των επιπλοκών που παρατηρούνται σε ηλικιωμένους ασθενείς με σοβαρές κακώσεις.

Επίσης, επιβαρυντικός παράγοντας για την πρόγνωση μετά από ΚΕΚ είναι και η παρουσία νόσων και βλαβών του εγκεφάλου προ της κάκωσης. Για παράδειγμα, στην περίπτωση ύπαρξης ισχαιμικής εγκεφαλοπάθειας ή εγκεφαλοπάθειας των μποξέρ (punch-drunk boxer’s syndrome), σχετικά μικρής έντασης εγκεφαλική κάκωση μπορεί να επιφέρει μια αθροιστικά πτωχή πρόγνωση.

Ισχυρούς προγνωστικούς παράγοντες αποτελούν επίσης και διάφοροι παράμετροι του κώματος. Είναι γνωστό ότι η κλίμακα Γλασκόβης εισόδου σχετίζεται με την πρόγνωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι το 80% των ασθενών πιθανόν να καταλήξει ή να παραμείνει σε φυτική κατάσταση όταν η κλίμακα Γλασκόβης είναι 3 με 4, ποσοστό το οποίο πέφτει στο 54% όταν η GCS είναι 5 με 7, και στο 27% όταν η Γλασκόβη εισόδου είναι 8 με 10 και τελικά στο 6% σε ασθενείς με καλή κλίμακα Γλασκόβης (11-15).

Ισχυρό προγνωστικό παράγοντα αποτελεί επίσης η ύπαρξη ή όχι σημείων βλάβης του στελέχους κατά την εισαγωγή. Αν για παράδειγμα το φωτοκινητικό αντανακλαστικό δεν εκλύεται αμφοτερόπλευρα, τότε η θνησιμότητα είναι 65% σε ασθενείς με εστιακή βλάβη στην CT (mass lesion) και 82% σε ασθενείς με διάχυτη εγκεφαλική βλάβη. Αν απουσιάζει το αιθουσοφθαλμικό αντανακλαστικό η θνησιμότητα πλησιάζει το 60%. Αντίδραση απεγκεφαλισμού σχετίζεται με 50% θνησιμότητα.

Κακό προγνωστικό παράγοντα αποτελούν επίσης οι διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος, όπως διαταραχές αναπνοής και κυκλοφορίας (π.χ. υπόταση).

Επίσης, η φύση της εγκεφαλικής κάκωσης έχει προγνωστική αξία. Για παράδειγμα, η ύπαρξη χωροκατακτητικής εξεργασίας αυξάνει σημαντικά τη θνητότητα. Για το λόγο αυτό, τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας έχουν προγνωστικό χαρακτήρα. Η πιο ευνοϊκή έκβαση σχετίζεται είτε με φυσιολογικό απεικονιστικό έλεγχο ή με την παρουσία υπόπυκνων αλλοιώσεων (οίδημα, οιδηματώδεις θλάσεις). Βλάβες υψηλής πυκνότητας (οξέα αιματώματα) σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση με την εξής σειρά: τη χειρότερη πρόγνωση έχει το επισκληρίδιο αιμάτωμα και ακολουθούν το οξύ υποσκληρίδιο αιμάτωμα, οξεία ενδοεγκεφαλική αιμορραγία, και αιμορραγικές θλάσεις.

Τέλος, η αυξημένη ενδοκράνια πίεση (>40mmHg) σε ασθενείς που νοσηλεύονται στην μονάδα εντατικής θεραπείας συνεπάγεται ελαττωμένη εγκεφαλική αιμάτωση και σχετίζεται με μη-ευνοϊκή έκβαση.

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΕΚ

Αλλαγές στην αιματική ροή του εγκεφάλου.

Ο μηχανισμός της αυτορύθμισης διατηρεί την αιματική ροή του εγκεφάλου σταθερή σε φυσιολογικά επίπεδα εγκεφαλικής πίεσης αιμάτωσης (cerebral perfusion pressure), που κυμαίνονται από 50 mmHg-150 mmHg. Μετά από ΚΕΚ, ο μηχανισμός της αυτορύθμισης διαταράσσεται, με αποτέλεσμα ο εγκέφαλος να είναι επιρρεπής σε ισχαιμία, λόγω χαμηλής πίεσης αιμάτωσης (με μειωμένη αιματική ροή) και σε αυξημένη ενδοκράνια πίεση λόγω υψηλής πίεσης αιμάτωσης (με αυξημένη αιματική ροή). Έχει βρεθεί ότι, όταν η αιματική ροή του εγκεφάλου είναι χαμηλότερη από 18 ml/100gm το λεπτό σχετίζεται με μη-ευνοϊκή έκβαση μετά από ΚΕΚ [8]. Έχει βρεθεί ότι κατά την οξεία φάση της ΚΕΚ, υπάρχει μια περίοδος μειωμένης αιματικής ροής. Επίσης, τις 3 πρώτες ημέρες μετά από ΚΕΚ, παρατηρείται φυσιολογική ή υψηλή αιματική ροή, η οποία συνήθως συνοδεύεται από χαμηλό μεταβολικό ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου [9]. Η αντιμετώπιση των αλλαγών στην αιματική ροή του εγκεφάλου μετά από ΚΕΚ μπορεί να επιτευχθεί με ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και τροποποίηση των παραμέτρων αερισμού.

Κυτταρικοί μηχανισμοί της ΚΕΚ

Δυσλειτουργία του μεταβολισμού του εγκεφάλου. Μετά από ΚΕΚ, παρατηρούνται αλλαγές τόσο στον οξειδωτικό μεταβολισμό όσο και στο ρυθμό της γλυκόλυσης. Μελέτες φανερώνουν ότι παρατηρείται αύξηση του μεταβολισμού της γλυκόζης (hyperglycolysis), η οποία παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά από ΚΕΚ [10], καθώς και μείωση του οξειδωτικού μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια του εγκεφάλου [11, 12]. Το Ν-ακέτυλ-ασπαρτικό οξύ (N-acetyl-aspartate) συντίθεται στα μιτοχόνδρια και συναντάται στους νευρώνες. Η μείωση της συγκέντρωσης του συστατικού αυτού σχετίζεται με τη σοβαρότητα της κάκωσης και πιθανό να αποτελεί δείκτη της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων [13, 14]. Μια μελέτη σε πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν ΚΕΚ, έδειξε ότι η δυσλειτουργία αυτή πιθανό να προκαλείται από αλλαγές στη δραστηριότητα της οξειδάσης II του κυτοχρώματος c (cytochrome c oxidase II) [15]. Επίσης, η μεταβολική δυσλειτουργία μπορεί να οφείλεται και στην ευαισθησία του τραυματισμένου εγκεφάλου σε σχετικά μικρές αλλαγές στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Τέλος, μια πληθώρα μελετών φανερώνει ότι η μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος του εγκεφάλου μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση του κλάσματος του εισπνεόμενου οξυγόνου [16-18]. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Ασβέστιο (Ca^{2+}). Σε φυσιολογικές συνθήκες, το ασβέστιο ρυθμίζει πολλές ζωτικές λειτουργίες των κυττάρων, με αποτέλεσμα η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του να ελέγχεται εκτεταμένα. Η υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου που παρατηρείται στον εξωκυττάριο χώρο είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του ιόντος διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, και τη ρύθμιση της συγκέντρωσής του στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι αντλίες αυτές που επιτρέπουν τη μεταφορά του ιόντος διαμέσου της μεμβράνης του κυττάρου, απαιτούν ATP (adenosine triphosphate) για να διατηρήσουν τη διαφορά συγκέντρωσης του Ca^{2+}. Η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων (N-methyl-D-aspartate) μετά από ΚΕΚ, προκαλεί την είσοδο Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα τα χαμηλά ενεργειακά επίπεδα των νευρώνων να εμποδίζουν την αντιμετώπιση της αυξημένης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης [19-22]. Στο εσωτερικό του κυττάρου, τα υψηλά επίπεδα Ca^{2+} ρυθμίζονται με τη βοήθεια του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων, καθώς και με την αλληλεπίδρασή του με κυτταρικές ουσίες, όπως η καλμοδουλίνη. Τέλος, η συνεχής αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} προκαλεί την ενεργοποίηση πρωτεασών, όπως οι φωσφολιπάσες, οι νουκλεάσες, και η υπεροξειδική δισμουτάση.

Ελεύθερες ρίζες. Η παραγωγή υπεροξειδικών και υδροξυλικών ριζών εντός λίγων λεπτών μετά από ΚΕΚ συνεισφέρει στο μονοπάτι της κυτταρικής βλάβης [23]. Οι ρίζες αυτές παράγονται από το μονοπάτι έκφρασης του αραχιδονικού οξέος, τη διαρροή των μιτοχονδρίων, τα λευκοκύτταρα, και από την απελευθέρωση καταλυτικά ενεργού σιδήρου από τη φερριτίνη, την τρανσφερρίνη, και την αιμοσφαιρίνη. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες αναστέλλει τη δράση των ενζύμων που εξαρτώνται από τα φωσφολιπίδια, αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, και μπορεί άμεσα να οδηγήσει στην καταστροφή της μεμβράνης του κυττάρου. Οι μηχανισμοί αυτοί επεμβαίνουν και σε άλλα μονοπάτια κυτταρικής βλάβης, μέσω αύξησης της συγκέντρωσης του ασβεστίου και του γλουταμινικού οξέος, τα οποία με τη σειρά τους επάγουν την περαιτέρω παραγωγή ελεύθερων ριζών [24-26].

Τοξικότητα. Το γλουταμινικό οξύ αποτελεί έναν από τους κύριους νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου και επάγει τη νευρωνική εκπόλωση, ενεργοποιώντας τρεις ξεχωριστές κατηγορίες υποδοχέων: τον N-methyl-d-aspartate υποδοχέα, τον metabotropic υποδοχέα, και την οικογένεια των Kainate και amino-3-hydroxy-5-methy-4-isoxazole propionate υποδοχέων. Η υπερενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων μπορεί να προκαλέσει νευρωνική εκπόλωση, οίδημα, και τελικά το θάνατο του νευρικού κυττάρου. Ο μηχανισμός δράσης των τριών αυτών υποδοχέων είναι παρόμοιος και καταλήγει στην αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Σε μελέτες με πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν ήπια και σοβαρή ΚΕΚ, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα γλουταμινικού οξέος [20-22]. Επίσης, σε πρόσφατες μελέτες ασθενών με ΚΕΚ ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα τοξικών αμινοξέων. Τα επίπεδα αυτά ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ (50 φορές πιο υψηλά από τα φυσιολογικά επίπεδα), σε ασθενείς με εγκεφαλικές θλάσεις ή σε ασθενείς που υπέστησαν δευτεροπαθή ισχαιμικά επεισόδια [27].

Κυτταροσκελετός. Η ΚΕΚ οδηγεί σε αξονική βλάβη και καταστροφή του κυτταροσκελετού, πιθανόν μέσω ενεργοποίησης της πρωτεάσης καλπεΐνης (protease calpain) [28, 29]. Η καλπεΐνη ενεργοποιείται μη-αναστρέψιμα από τα αυξημένα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Μελέτες σε μοντέλα τρωκτικών που υπέστησαν ΚΕΚ έδειξαν ότι η αναστολή της δράσης της καλπεΐνης οδηγεί σε βελτίωση της νευρολογικής έκβασης [30, 31].

Απόπτωση

Μελέτες τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και σε ασθενείς που υπέστησαν ΚΕΚ, φανερώνουν ότι ο νευρωνικός θάνατος πιθανό να μην είναι ένα μη-αναστρέψιμο μονοπάτι καταστροφικών γεγονότων. Αντίθετα, σε μερικούς κυτταρικούς πληθυσμούς πιθανό να είναι συνέπεια μιας πολύπλοκης αλληλουχίας γεγονότων που επάγονται από την ενεργοποίηση ειδικών γονιδίων [32-35]. Η αναστολή της απόπτωσης μέσω του NGF παράγοντα (nerve growth factor) οδηγεί στη βελτίωση της νευρολογικής έκβασης μετά από πειραματική ΚΕΚ [36]. Οι πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην επιβίωση των νευρωνικών πληθυσμών (Bcl-2) και οι πρωτεΐνες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο (οικογένεια κασπασών) παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποκατάσταση των κατεστραμμένων νευρικών κυττάρων ή την απόπτωση μετά από ΚΕΚ [37].

Εγκεφαλικό οίδημα

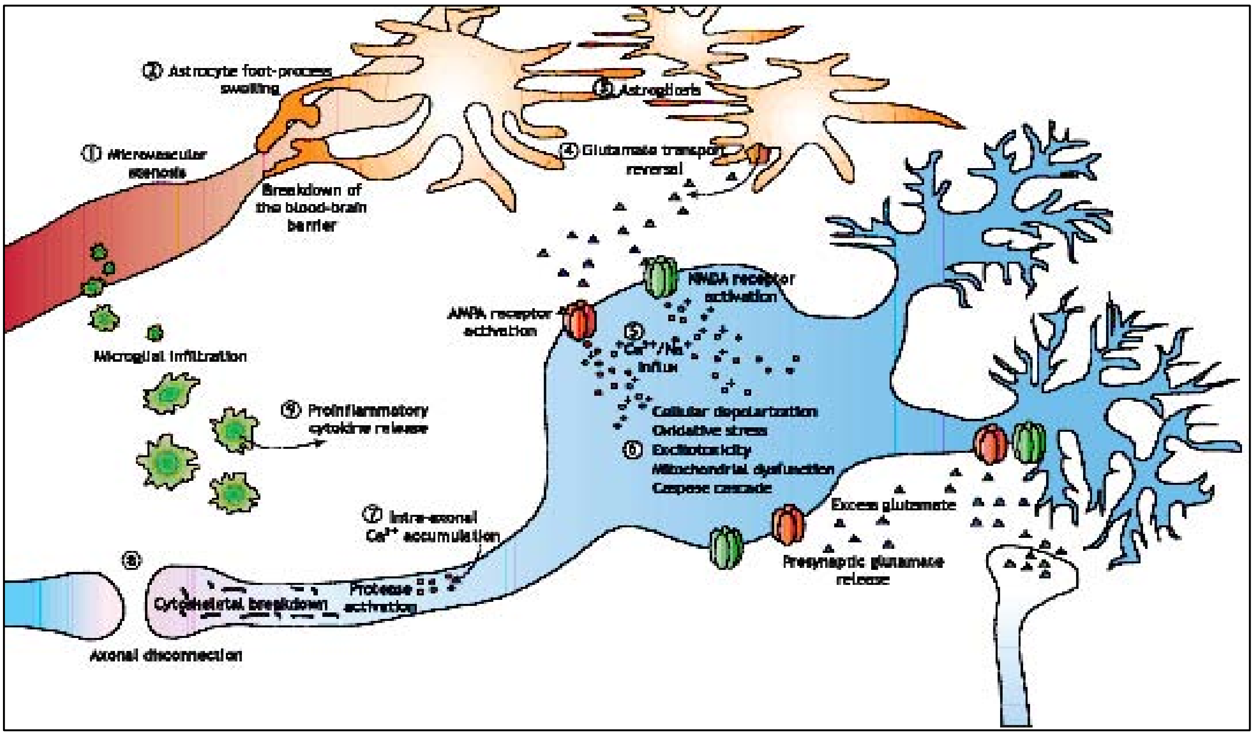
Το οίδημα του εγκεφάλου που προκαλείται από ΚΕΚ, μπορεί να είναι αγγειοκινητικό (vasogenic edema) ή κυτταροτοξικό (cytotoxic edema).Το αγγειοκινητικό οίδημα προέρχεται από τη διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, με αποτέλεσμα τη διαρροή υγρού στον εξωκυττάριο χώρο. Το κυτταροτοξικό οίδημα προκαλείται από οίδημα των νευρώνων ή της γλοίας. Μετά από ΚΕΚ, παρατηρείται μια πρώιμη διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, η οποία στις περιοχές της εγκεφαλικής θλάσης είναι πιο εκτεταμένη. Σε ασθενείς με πολλαπλές θλάσεις, η εκτεταμένη αυτή διάσπαση μπορεί να καταλήξει σε μαζικό οίδημα και αυξημένη ενδοκράνια πίεση. Πρόσφατες μελέτες φανερώνουν ότι είναι πιθανή η ανάπτυξη κυρίως κυτταροτοξικού οιδήματος κατά την μετατραυματική εγκεφαλική βλάβη. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση της διάχυσης του νερού 45min μετά από πειραματική ΚΕΚ, με ακόλουθο εκτεταμένο ενδοκυττάριο οίδημα που παρέμεινε για 2 εβδομάδες μετά την βλάβη [38]. Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων που σχετίστηκε με την ανάπτυξη εκτεταμένου οιδήματος στην περιοχή της αιμορραγίας [39]. Είναι πιθανό η απελευθέρωση του VEGF παράγοντα (vascular endothelial growth factor) από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να συμμετέχει στο μηχανισμό σχηματισμού του οιδήματος.

Το εκτεταμένο εγκεφαλικό οίδημα μπορεί να οδηγήσει σε εγκολεασμό. Σε περίπτωση που το οίδημα είναι ημισφαιρικό και μονόπλευρο μπορεί να προκύψει σκηνιδιακός εγκολεασμός, με συνέπεια τη συμπίεση των αρτηριών του μεσολοβίου ή της οπίσθιας εγκεφαλικής αρτηρίας, αντίστοιχα. Πιο εκτεταμένο οίδημα μπορεί να οδηγήσει σε εγκολεασμό της αγκιστρωτής έλικας, συμπίεση του εγκεφαλικού στελέχους, και τελικά θάνατο.

Εγκεφαλική ισχαιμία

Μελέτες σε εγκεφάλους ασθενών που υπέστησαν ΚΕΚ επιβεβαιώνουν την παρουσία ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης, γεγονός που φανερώνει ότι ο τραυματισμένος εγκεφαλικός ιστός είναι ευαίσθητος στην ανάπτυξη ισχαιμίας. Επίσης, υπολογίζεται ότι το 35% των ασθενών με ΚΕΚ εμφανίζουν τουλάχιστον ένα επεισόδιο υπότασης (συστολική αρτηριακή πίεση<90 mmHg) ή υποξίας (PaO2<60 mmHg). Η θνησιμότητα είναι πιο αυξημένη σε ασθενείς που εκδηλώνουν ένα επεισόδιο υπότασης σε σύγκριση με εκείνους χωρίς υπόταση.

Η μέτρηση του κορεσμού του φλεβικού οξυγόνου στο σφαγιτιδικό βολβό διευκολύνει τη διάγνωση της εγκεφαλικής ισχαιμίας. Η εγκεφαλική ισχαιμία προκαλεί μείωση του κορεσμού του οξυγόνου σε επίπεδα χαμηλότερα από 50 mmHg. Έτσι, μια μελέτη έδειξε ότι το 39% των ασθενών με σοβαρή ΚΕΚ εμφανίζουν τουλάχιστον ένα επεισόδιο μη-κορεσμού του σφαγιτιδικού βολβού [40]. Επίσης, τα επεισόδια αυτά σχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα και φανερώνουν ότι η ισχαιμία αποτελεί σημαντικό στοιχείο της δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ. Ωστόσο, επιπλέον μελέτες φανερώνουν ότι η αύξηση της εγκεφαλικής πίεσης αιμάτωσης (>60 mmHg) δεν βελτιώνει την εγκεφαλική έκβαση, και πιθανό να επιδεινώνει το εγκεφαλικό οίδημα [41]. Σε μια μελέτη πειραματικών μοντέλων και ασθενών που υπέστησαν ΚΕΚ βρέθηκε διάχυτη θρόμβωση στο εσωτερικό των εγκεφαλικών αγγείων [42]. Το εύρημα αυτό πιθανό να αντιπροσωπεύει έναν επιπρόσθετο μηχανισμό για την εκδήλωση εγκεφαλικής ισχαιμίας.



Εικόνα: Παθοφυσιολογία της ΚΕΚ: Κύριοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την εξέλιξη της δευτεροπαθούς βλάβης μετά από ΚΕΚ. Διαταραχές της ροής του αίματος στα μικρά αγγεία περιλαμβάνουν στένωση (1) και απώλεια μικραγγείωσης, ενώ η διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού πιθανό να είναι αποτέλεσμα διόγκωσης των αστροκυττάρων (2). Ο πολλαπλασιασμός των αστροκυττάρων (“αστρογλοίωση’’) (3) αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό κακώσεων του ΚΝΣ, και η δυσλειτουργία τους επάγει την αναστροφή της εισροής του γλουταμινικού οξέος (4) και την εκπόλωση των νευρώνων μέσω τοξικοδιεγερτικών (excitotoxic) μηχανισμών. Σε κακώσεις της λευκής και φαιάς ουσίας, η εισροή Ca (5) ενεργοποιεί μοριακά μονοπάτια που καταλήγουν σε όψιμη κυτταρική απόπτωση ή δυσλειτουργία ή αξονική βλάβη. Στους νευρώνες, η εισροή Ca και Zn μέσω καναλιών στους AMPA και NMDA υποδοχείς συνεπάγεται τοξικοδιεγερτική βλάβη (6), παραγωγή ελεύθερων ριζών, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και μετασυναπτικές τροποποιήσεις των υποδοχέων. Οι μηχανισμοί αυτοί δεν εκλύονται παντού στον ίδιο βαθμό, αλλά εξαρτώνται από τις υποκυτταρικές οδούς εισροής Ca, καθώς και το μέγεθος της κάκωσης. Η εισροή Ca στους άξονες (7) ενεργοποιεί μια σειρά μονοπατιών εκφυλισμού πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την αξονική βλάβη (8). Επίσης, τα φλεγμονώδη κύτταρα συμμετέχουν στην δευτεροπαθή βλάβη, μέσω απελευθέρωσης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (9) και συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικής απόπτωσης ή μετασυναπτικών τροποποιήσεων των υποδοχέων [43].

ΚΕΚ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Εισαγωγή

Το μέγεθος της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ καθορίζεται από τις πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς βλάβες. Η πρωτοπαθής εγκεφαλική βλάβη προέρχεται από τις μηχανικές δυνάμεις που εφαρμόζονται στο κρανίο και τον εγκέφαλο τη στιγμή της πρόσκρουσης. Η δευτεροπαθής εγκεφαλική βλάβη συμβαίνει μετά το αρχικό τραύμα και είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων διεργασιών που ενεργοποιούνται από την πρωτοπαθή βλάβη. Η πρώιμη υποξία και η υπόταση που εκδηλώνονται στα αρχικά στάδια της ΚΕΚ αποτελούν τους κύριους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης [44-49]. Οι πιο συχνές μορφές δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης περιλαμβάνουν τις βλάβες λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, εγκεφαλικού οιδήματος, ενδοκράνιας αιμορραγίας και ενδοκράνιας υπέρτασης [50]. Μελέτες φανερώνουν ότι η δευτεροπαθής εγκεφαλική βλάβη εμφανίζεται στο 70-90% των ασθενών με θανατηφόρα ΚΕΚ.

Εικόνα: Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης μετά από σοβαρή ΚΕΚ. Η πρωτοπαθής εγκεφαλική βλάβη προέρχεται από τις μηχανικές δυνάμεις που εφαρμόζονται τόσο στο κρανίο όσο και στον εγκέφαλο τη στιγμή της πρόσκρουσης. Η δευτεροπαθής εγκεφαλική βλάβη είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων διεργασιών που επάγονται από την πρωτοπαθή βλάβη.

Η αλληλουχία των γεγονότων που συνεισφέρει στην ανάπτυξη της δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Αυτό οφείλεται στην ποικιλότητα των ενδογενών παραγόντων που απελευθερώνονται στον ενδοκράνιο χώρο μετά το τραύμα και την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεών τους. Ανάμεσα σ' αυτούς, σημαντικό ρόλο παίζουν διάφοροι τοπικοί παράγοντες στο σημείο της βλάβης, όπως η αγγειοσύσπαση και η ελαττωμένη αιμάτωση, η απελευθέρωση κυτταροτοξικών ουσιών (ιόντα Ca^{2+}, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, αραχιδονικό οξύ, corticotropin releasing factor) και η παραγωγή διάφορων επιβλαβών πρωτεϊνών [51-54]. Τελευταία, όλο και περισσότερο γίνεται φανερό ότι η φλεγμονώδης αντίδραση [55, 56] παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από τραύμα [57]. Αυτή περιλαμβάνει τη διήθηση ανοσοποιητικών κυττάρων και τη δημιουργία οιδήματος στο σημείο του τραύματος. Επίσης, ενεργοποιούνται διάφορα φλεγμονώδη εγκεφαλικά κύτταρα (αστροκύτταρα, μικρογλοία, ενδοθηλιακά κύτταρα), με αποτέλεσμα την παραγωγή ποικίλων φλεγμονωδών μορίων όπως είναι το συμπλήρωμα [58], διάφορες πρωτεΐνες οξείας φάσης (πρόδρομο μόριο του β-αμυλοειδούς, α1-αντιχυμοτρυψίνη [59], μόρια προσκόλλησης [60]) και προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες [61]. Γενικά, όσο μεγαλύτερη είναι η έκταση της φλεγμονώδους αντίδρασης τόσο μεγαλύτερη είναι και η βλάβη του εγκεφαλικού ιστού.

Γονίδια άμεσης απόκρισης και πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας

Άλλοι παράγοντες που συμμετέχουν στην άμεση αντίδραση του εγκεφάλου μετά από εγκεφαλικό τραύμα είναι τα γονίδια άμεσης απόκρισης (immediate early genes, IEGs) και οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (heat shock proteins). Η οικογένεια των IEGs γονιδίων περιλαμβάνει πρωτο-ογκογονίδια των c-fos και c-jun οικογενειών [62, 63]. Τα γονίδια αυτά διευκολύνουν τη μεταγραφή άλλων γονιδίων που συμμετέχουν στη νευρωνική αντίδραση μετά από εγκεφαλική κάκωση. Τέτοια γονίδια-στόχοι είναι εκείνα που κωδικοποιούν τον NGF παράγοντα (Nerve Growth Factor) [64] ή το πρόδρομο μόριο του β-αμυλοειδούς (APP) [65]. Επίσης, η έκφραση μερικών IEGs γονιδίων, κυρίως των c-fos και c-jun, έχει συσχετιστεί με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [66, 67]. Η παρουσία των IEGs γονιδίων (c-fos, c-jun, junB) στον εγκεφαλικό φλοιό ή τον ιππόκαμπο μετά από εγκεφαλικό τραύμα (mRNA μετάγραφα και πρωτεΐνη) φανερώνει ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών αποτελεί ένα ενδιάμεσο στάδιο ανάμεσα στις πρώιμες και όψιμες αντιδράσεις του εγκεφάλου μετά από εγκεφαλική κάκωση.

Την έκφραση των IEGs γονιδίων μετά από εγκεφαλικό τραύμα ακολουθεί η έκφραση μιας πρωτεΐνης θερμικής καταπληξίας με μοριακό βάρος 72kDa (hsp72). Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας αποτελούν μια εξελικτικά σταθερή οικογένεια πρωτεϊνών, τα μέλη της οποίας έχουν μεγάλες δομικές ομοιότητες. Το επίπεδο σύνθεσής τους αυξάνεται δραματικά όταν τα κύτταρα βρεθούν σε δύσκολες συνθήκες [68]. Για το λόγο αυτό αναφέρονται και ως πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας ή stress πρωτεΐνες. Ο ακριβής ρόλος της έκφρασης της hsp72 στον εγκεφαλικό φλοιό μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο, πιθανόν η ενεργοποίηση της σύνθεσής της να είναι αποτέλεσμα των συνθηκών stress που επικρατούν στα εγκεφαλικά κύτταρα μετά από εγκεφαλικό τραύμα [69]. Επίσης, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η επαγωγή της έκφρασης της hsp72 πιθανόν να συμβάλλει στην προστασία των νευρωνικών πληθυσμών [70].

Γονίδιο	**Μοντέλο πειραματικής ΚΕΚ σε πειραματόζωα**	**Περιοχή του εγκεφάλου**
c-fos	Μοντέλο πειραματικής ΚΕΚ σε πειραματόζωα μέσω ταχείας έκχυσης φυσιολογικού ορού ενδοκρανιακά (fluid percussion brain injury)	Φλοιός Ιππόκαμπος
	Εγκεφαλική κάκωση μέσω ελεγχόμενης μηχανικής κρούσης του φλοιού του εγκεφάλου (controlled cortical impact brain injury)	Φλοιός Ιππόκαμπος
	Εγκεφαλική ισχαιμία	Φλοιός, ιππόκαμπος
	Διατιτραίνων τραύμα του εγκεφάλου	Φλοιός, ιππόκαμπος
c-jun	Μοντέλο πειραματικής ΚΕΚ σε πειραματόζωα μέσω ταχείας έκχυσης φυσιολογικού ορού ενδοκρανιακά	Ιππόκαμπος
junB	Εγκεφαλική ισχαιμία	Φλοιός, ιππόκαμπος
	Μοντέλο πειραματικής ΚΕΚ σε πειραματόζωα μέσω ταχείας έκχυσης φυσιολογικού ορού ενδοκρανιακά	Φλοιός Ιππόκαμπος
hsp72	Μοντέλο πειραματικής ΚΕΚ σε πειραματόζωα μέσω ταχείας έκχυσης φυσιολογικού ορού ενδοκρανιακά	Φλοιός
	Εγκεφαλική ισχαιμία	Φλοιός, ιππόκαμπος
	Διατιτραίνων τραύμα του εγκεφάλου	Φλοιός
	Επιληπτικές κρίσεις	Ιππόκαμπος

Πίνακας: Έκφραση IEGs γονιδίων και γονιδίων θερμικής καταπληξίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα μετά από εγκεφαλική κάκωση.

Κυτοκίνες και φλεγμονή

Οι κυτοκίνες είναι μια ετερογενής ομάδα πολυπεπτιδικών ορμονών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και με την φλεγμονώδη αντίδραση. Παράγονται και δρουν σε ιστούς τόσο του περιφερικού όσο και του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) [71, 72]. Ανοσοποιητικά κύτταρα όπως μακροφάγα, Τ και Β λεμφοκύτταρα, καθώς και μια ποικιλία άλλων κυττάρων όπως ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα αποτελούν περιφερικές πηγές κυτοκινών που συναντώνται στο ΚΝΣ. Αν και η ΚΕΚ οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, διείσδυση ουδετερόφιλων παρατηρείται 6h μετά την κάκωση, ενώ Τ λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα εμφανίζονται 12-24h μετά την κάκωση ή αργότερα [73, 74]. Απουσία ωστόσο λευκοκυττάρων, έχει παρατηρηθεί επίσης γρήγορη επαγωγή κυτοκινών μετά από ποικίλες κακώσεις. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι τα ενδογενή κύτταρα του εγκεφάλου είναι υπεύθυνα για την πρώιμη έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης εντός του ΚΝΣ μετά από τραύμα. Πολλές μελέτες φανερώνουν ότι η μικρογλοία, τα αστροκύτταρα, οι νευρώνες, τα περιαγγειακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κυτοκινών.

Στο ΚΝΣ, οι κυτοκίνες ασκούν τη δράση τους αλληλεπιδρώντας με τους κατάλληλους υποδοχείς, που εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια της γλοίας και των νευρώνων. Ωστόσο, μελέτες αναφέρουν ότι οι κυτοκίνες μπορούν να επηρεάσουν και να αναστείλουν τη λειτουργία ορισμένων υποδοχέων. Για παράδειγμα, η IL-1 τροποποιεί τη δραστηριότητα των GABA (g-aminobutyric acid) υποδοχέων στον εγκεφαλικό ιστό [75]. Επίσης, η IL-1 τροποποιεί τη συναπτική πλαστικότητα και εμποδίζει τη διατήρηση της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (long-term potentiation) [76].

Έκφραση κυτοκινών και υποδοχέων μετά από ΚΕΚ

Μελέτες φανερώνουν ότι η συγκέντρωση διάφορων κυτοκινών τόσο στον εγκεφαλικό ιστό όσο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) αυξάνεται κατά τη διάρκεια της πρώιμης και της χρόνιας περιόδου μετά το εγκεφαλικό τραύμα.

Ιντερλευκίνη-1 (IL-1)

Η έκφραση της IL-1β στον εγκεφαλικό ιστό αυξάνεται δραματικά σε πολλές οξείες [77, 78] και χρόνιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες [72]. Σε μελέτες τρωκτικών που υπέστησαν ΚΕΚ έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση της IL-1β στον εγκέφαλο (εγκεφαλικό φλοιό και ιππόκαμπο) κατά τη διάρκεια της πρώιμης περιόδου μετά την κάκωση (mRNA μετάγραφα εντός 15min και πρωτεΐνη εντός 1h) με κορύφωση την 6^{η} ώρα [79, 80]. Παρόμοια, σε αρουραίους που υπέστησαν ισχαιμία στην περιοχή του πρόσθιου εγκεφάλου παρατηρήθηκε επαγωγή του mRNA της IL-1β 15min μετά την ισχαιμία [81].

Σε μεταθανάτιες παθολογοανατομικές μελέτες ασθενών που κατέληξαν από κρανιοεγκεφαλική κάκωση ή εγκεφαλικό επεισόδιο βρέθηκε αυξημένη έκφραση IL-1 στο ΕΝΥ ή τον εγκεφαλικό ιστό. Η αυξημένη δραστηριότητα της IL-1β στο ΕΝΥ ασθενών με εγκεφαλικό τραύμα σχετίζεται με την επακόλουθη δυσλειτουργία του μεταβολισμού, την ενεργοποίηση των αντιδράσεων οξείας φάσης και τη πιθανή νευρολογική επιδείνωση του ασθενούς [82].

Η ακριβής κυτταρική πηγή της IL-1β μετά από εγκεφαλική βλάβη δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Ωστόσο, κύριες πηγές της θεωρούνται τα ενδοθηλιακά και περιαγγειακά κύτταρα, η μικρογλοία και τα μακροφάγα/μονοκύτταρα. Επίσης, μερικές μελέτες αναφέρουν ότι οι νευρώνες, τα αστροκύτταρα καθώς και τα ολιγοδεντροκύτταρα [83] 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 [84]. Η έκφραση της μετά από εγκεφαλική βλάβη συμβαδίζει με αυτή της IL-1β αν και η IL-1β επάγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες [85, 86]. Κύριες πηγές της IL-1α, όπως και της IL-1β στον εγκέφαλο, θεωρούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η μικρογλοία, τα μακροφάγα και οι νευρώνες [87].

Κρανιοεγκεφαλική κάκωση			
mRNA	Φλοιός, ιππόκαμπος	Αρουραίοι	Fan et al. [88](1995), Shohami et al(1997), Szaflarski et al[89] (1995)
	Μεσολόβιο, ραβδωτό σώμα, πρόσθιος σύνδεσμος, πλάγια οσφρητική οδός	Αρουραίοι	Yan et al. [90] (1992)
	Φλοιός, μεσολόβιο, ραβδωτό σώμα	Αρουραίοι	Woodroofe et al. [91] (1991)
	Νωτιαίος μυελός	Αρουραίοι	Wang et al. [92] (1997)
	Φλοιός	Ποντίκια	Rostworowski et al. [93] (1997)
	Φλοιός	Ποντίκια	Herx et al. [94] (2000)
Πρωτεΐνη	Φλοιός, ιππόκαμπος	Αρουραίοι	Taupin et al (1993)
	Φλοιός, ιππόκαμπος, ραβδωτό σώμα, θάλαμος, στέλεχος παρεγκεφαλίδα, μεσολόβιο	Ποντίκια	Tchelingerian et al. (1993)
	Ιππόκαμπος	Αρουραίοι	Fagan and Gage [95] (1990)
	Ραβδωτό σώμα	Αρουραίοι	Yan et al. (1992)
	Νωτιαίος μυελός	Αρουραίοι	Wang et al. (1997)

Πίνακας: Έκφραση της IL-1 στο κεντρικό νευρικό σύστημα μετά από εγκεφαλική κάκωση.

Η έκφραση της IL-1α, της IL-1RA και των υποδοχέων της IL-1 μετά από εγκεφαλική βλάβη δεν έχει διερευνηθεί εκτεταμένα. Σε ποντίκια που υπέστησαν προσωρινή ή μόνιμη σύγκλειση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας παρατηρήθηκε ότι το mRNA της IL-1α επάγεται πολύ νωρίτερα από το mRNA της IL-1β. Επίσης, στην ίδια μελέτη, το mRNA της IL-1RA επάγεται 6h μετά από τη σύγκλειση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας και παραμένει σε αυξημένα επίπεδα για τις επόμενες 5 ημέρες [96]. Οι κυτταρικές πηγές της IL-1RA δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί.

Το mRNA για τους υποδοχείς της IL-1 επάγεται μετά από εγκεφαλική βλάβη. Ωστόσο, η ρύθμιση της έκφρασης των δύο τύπων υποδοχέων της IL-1 είναι διαφορετική. Έτσι, η έκφραση του υποδοχέα τύπου I (IL-1RI) αυξάνεται μόνο κατά το όψιμο στάδιο της βλάβης, ενώ ο υποδοχέας τύπου II (IL-1RII) ενεργοποιείται 3h μετά την εγκεφαλική βλάβη. Μελέτες αναφέρουν ότι πιθανή κυτταρική πηγή του υποδοχέα τύπου I είναι οι νευρώνες [97].

Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)

Μελέτες σε εγκεφάλους αρουραίων που υπέστησαν εγκεφαλικό τραύμα φανερώνουν ότι η έκφραση της IL-6 αυξάνεται 6-8h μετά την κάκωση [61]. Σε κλινικές μελέτες ασθενών με χρόνια υποσκληρίδια αιματώματα μετά από ΚΕΚ, ανιχνεύτηκαν αυξημένα επίπεδα IL-6 στην περιοχή του αιματώματος, γεγονός που συσχετίστηκε με την επανεμφάνιση του αιματώματος [98].

Σε μελέτες ασθενών με εγκεφαλικό τραύμα ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα IL-6 και του υποδοχέα της (IL-6R) στον ορό ή το ΕΝΥ. Σε πολλές περιπτώσεις τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της IL-6 σχετίζονται με την έκταση της βλάβης του εγκεφαλικού ιστού και/ή την έκβαση του ασθενούς. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η αυξημένη έκφραση της κυτοκίνης αυτής και του υποδοχέας της σχετίζεται με την ενεργοποίηση των αντιδράσεων οξείας φάσης και την απελευθέρωση του νευροτροφικού παράγοντα NGF (nerve growth factor) [99]. Έτσι, η IL-6 πιθανόν να συντίθεται στον εγκεφαλικό ιστό και να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό που έχει υποστεί βλάβη στην περιοχή της κάκωσης, επηρεάζοντας τη λειτουργία άλλων οργάνων. Κύριες κυτταρικές πηγές της IL-6 μετά από εγκεφαλικό τραύμα θεωρούνται οι νευρώνες, η μικρογλοία, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδεντροκύτταρα και τα λευκοκύτταρα που μετακινούνται προς τον τραυματισμένο εγκεφαλικό ιστό [90, 100]. Επίσης, κύριες πηγές του υποδοχέα της IL-6 (IL-6R) θεωρούνται οι νευρώνες και τα ολιγοδεντροκύτταρα.

Ενδείξεις συμμετοχής κυτοκινών στην εγκεφαλική βλάβη μετά από κάκωση

Ιντερλευκίνη-1

Πολλές μελέτες φανερώνουν ότι η IL-1 συμμετέχει στην παθογένεση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από κάκωση [101]. Έτσι, η χορήγηση IL-1β σε πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν εγκεφαλική κάκωση επιδεινώνει δραματικά την εγκεφαλική βλάβη [84, 102]. Επίσης, in vivo, η ενδοεγκεφαλική χορήγηση ανασυνδυασμένης IL-1 επιδεινώνει την εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται από ισχαιμία ή χορήγηση τοξικών ουσιών [103-105].

Αντίθετα, η χορήγηση αντισωμάτων που αναστέλλουν τη δράση της IL-1β [103] ή αναστολέων της ICE (IL-1β converting enzyme) [106] 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 [37]. Ωστόσο, Knockout ποντίκια για το γονίδιο της IL-1α ή της IL-1β δεν εμφανίζουν βελτίωση της εγκεφαλικής βλάβης που προκαλείται από σύγκλειση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας. Αντίθετα, ποντίκια με έλλειψη και των δύο γονιδίων παρουσιάζουν δραματική μείωση της εγκεφαλικής βλάβης [107].

Η παρουσία της IL-1RA στον φυσιολογικό εγκέφαλο και η ενεργοποίηση της έκφρασής της μετά από εγκεφαλική βλάβη φανερώνουν ότι η IL-1RA μετριάζει τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που επάγονται από την εγκεφαλική κάκωση [108, 109]. Η χορήγηση ανασυνδυασμένης IL-1RA [110] στον εγκεφαλικό ιστό τρωκτικών αναστέλλει την εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται από εγκεφαλική ισχαιμία, εγκεφαλική κάκωση ή χορήγηση τοξικών ουσιών [111-113]. Σε αρουραίους παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση IL-1RA εντός του ΚΝΣ εμποδίζει τη δράση της IL-1 και αναστέλλει τον εκφύλιση των νευρικών κυττάρων που επάγεται από εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία [114]. Παρόμοια, η χορήγηση IL-1RA εντός του ΚΝΣ μειώνει την έκταση της βλάβης του εγκεφαλικού φλοιού που προκαλούνται μετά από ΚΕΚ (fluid percussion injury) [112]. Στο ίδιο πειραματικό μοντέλο, η συστηματική χορήγηση IL-1RA μειώνει την απώλεια νευρωνικών κυττάρων στις περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού και του ιππόκαμπου [109]. Επίσης, η υπερέκφραση της IL-1RA στον εγκέφαλο αναστέλλει την εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται από ισχαιμία [115].

Μελέτες σε αρουραίους που υπέστησαν εγκεφαλική ισχαιμία φανερώνουν ότι η χορήγηση αντισωμάτων που αναστέλλουν τη δράση της ενδογενούς IL-1RA επιδεινώνει την εγκεφαλική βλάβη [116].

Ιντερλευκίνη-6

Μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου της IL-6 παρέχουν αντιφατικά αποτελέσματα. Σε μια πρώτη μελέτη, ποντίκια που υπέστησαν εγκεφαλικό τραύμα [117] εμφανίζουν μειωμένη επαγωγή φλεγμονώδους αντίδρασης και αυξημένο κυτταρικό θάνατο νευρωνικών πληθυσμών. Σε άλλη μελέτη, τα Knockout ποντίκια παρουσιάζουν παρόμοια έκβαση μετά από εγκεφαλική ισχαιμία σε σύγκριση με ποντίκια που διαθέτουν το φυσιολογικό γονίδιο της IL-6 (wild type mice) [118].

Ιντερλευκίνη-18 (IL-18)

Ένα άλλο μέλος της οικογένειας της IL-1 είναι η IL-18, η οποία επάγει την έκφραση της IFN-γ (Interferon-gamma). Στο ΚΝΣ, τα επίπεδα συγκέντρωσής της αυξάνονται μετά από ποικίλες φλεγμονώδεις συνθήκες, όπως μόλυνση ή ισχαιμικά και αυτοάνοσα νευρολογικά νοσήματα [77, 119-121]. Πρόσφατες κλινικές μελέτες σε ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ φανερώνουν ότι υπάρχει επαγωγή της IL-18 στον ενδοκράνιο χώρο [122, 123] μετά από εγκεφαλική κάκωση. Σ' αυτές τις μελέτες, η μετατραυματική ενεργοποίηση της IL-18 αναστέλλονταν από τη συστηματική χορήγηση ενός αναστολέα, της IL-18BP (IL-18 binding protein). Επίσης, η αγωγή με IL-18BP κατέληγε σε βελτίωση της νευρολογικής έκβασης κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά το τραύμα. Ακόμα, στις κλινικές αυτές μελέτες ανιχνεύτηκαν αυξημένα επίπεδα IL-18 στο ΕΝΥ, τα οποία παρέμειναν υψηλά για περισσότερο από μία εβδομάδα μετά την κάκωση [122].

Ιντερλευκίνη-12 (IL-12)

Η IL-12 είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη, η οποία τροποποιεί τη δράση της IFN-γ [124]. Στο ΚΝΣ, η σύνθεσή της επάγεται από διάφορους φλεγμονώδεις παράγοντες [125]. Κύριες κυτταρικές πηγές της ετεροδιμερούς αυτής κυτοκίνης είναι τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία. Στον άνθρωπο, έχουν ανιχνευτεί αυξημένα επίπεδα IL-12 στον ενδοκράνιο χώρο, μετά από ποικίλες νευροπαθολογικές καταστάσεις, όπως η βακτηριακή μηνιγγίτιδα [126], η σκλήρυνση κατά πλάκας [127], και η ΚΕΚ [128]. Σε ασθενείς που υπέστησαν ΚΕΚ, τα επίπεδα της IL-12 στο ΕΝΥ ήταν αυξημένα για περισσότερες από 14 ημέρες μετά το τραύμα, σε σύγκριση με τα ελεγχόμενα δείγματα ορού και ΕΝΥ φυσιολογικών ατόμων.

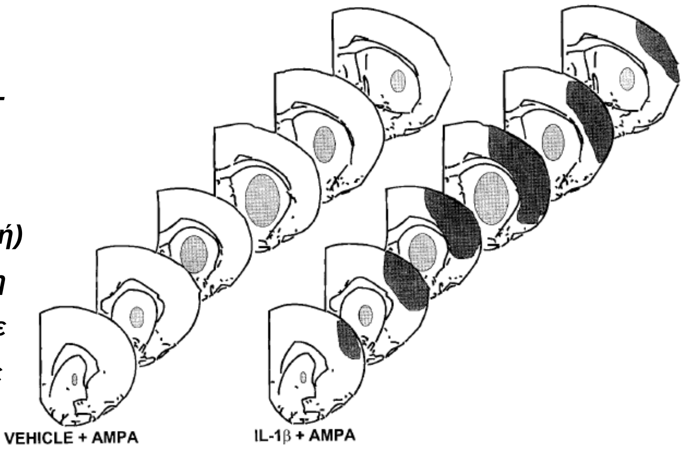
Γενικά, οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και ειδικότερα η IL-1 επιδεινώνουν την εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται από εγκεφαλική κάκωση και εγκεφαλική ισχαιμία. Επίσης, πολλές μελέτες φανερώνουν ότι η ενδογενής IL-1 συμμετέχει άμεσα στη νευροεκφύλιση που επάγεται σε διάφορα πειραματικά μοντέλα. Αντίθετα, οι αντι-φλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-4, IL-10 [129, 130] και IL-1RA) μειώνουν το μέγεθος της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ποικίλες βλάβες. Όσον αφορά την IL-6 (προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη με ίδιες περίπου ιδιότητες με την IL-1), μελέτες φανερώνουν ότι σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να δρα και ως αντι-φλεγμονώδης κυτοκίνη. Η δράση της εξαρτάται από τη συγκέντρωση καθώς και το χρόνο και την περιοχή έκφρασής της. Για παράδειγμα, μελέτες σε τρωκτικά που υπέστησαν ισχαιμική ή τοξική βλάβη φανερώνουν ότι η ενδοεγκεφαλική χορήγηση IL-6 αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο των νευρωνικών πληθυσμών [131, 132]. Αντίθετα, η υπερέκφραση IL-6 στον εγκεφαλικό ιστό ποντικιών οδηγεί σε εκφύλιση των νευρικών κυττάρων [133]. Αυτό φανερώνει ότι η χρόνια έκφραση IL-6 πιθανόν να έχει νευροτοξικά αποτελέσματα.

Δράση της IL-1 ανάλογα με την εντόπιση στον εγκέφαλο

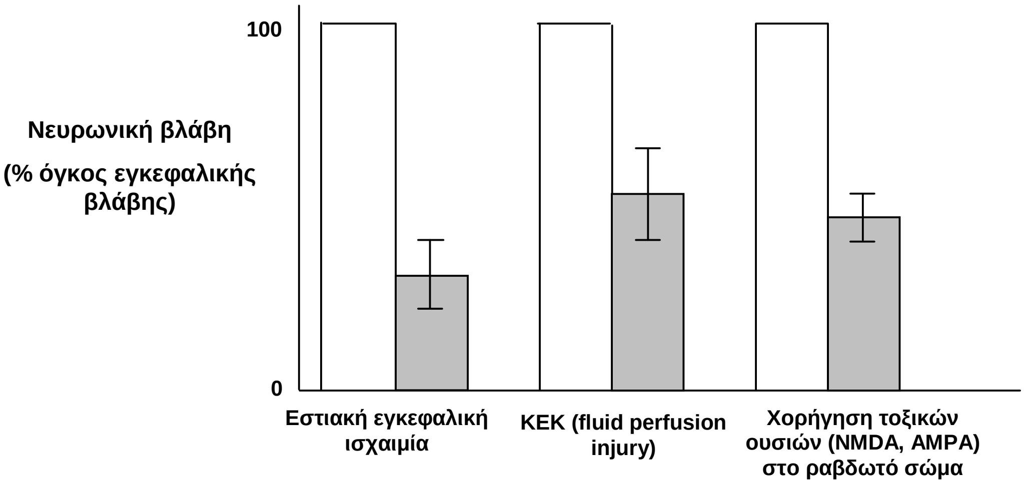
Μελέτες φανερώνουν ότι η χορήγηση IL-1 και IL-1RA στον εγκεφαλικό ιστό αρουραίων μπορεί να επηρεάσει τον κυτταρικό θάνατο νευρωνικών πληθυσμών σε απομακρυσμένες περιοχές του εγκεφάλου. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση IL-1 στις εγκεφαλικές κοιλίες ή το ραβδωτό σώμα πειραματικών μοντέλων που υπέστησαν σύγκλειση 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 [116] 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 την τοξική ουσία S-AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid: ανταγωνιστής του γλουταμινικού οξέος που δρα μέσω AMPA/kainate υποδοχέων) 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.

Εικόνα: Απεικόνιση βλάβης του εγκεφαλικού φλοιού μετά από χορήγηση S-AMPA ή συνδυασμού S-AMPA και IL-1 εντός του ραβδωτού σώματος αρουραίων. Αριστερά φαίνεται η βλάβη (σκιασμένη περιοχή) που προκαλείται μετά από χορήγηση S-AMPA (7.5nmol). Χορήγηση IL-1 σε συνδυασμό με S-AMPA καταλήγει σε εκτεταμένη βλάβη του εγκεφαλικού φλοιού (δεξιά).



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.



Εικόνα: Απεικόνιση των νευροπροστατευτικών επιδράσεων ανασυνδυασμένης IL-1RA σε τρωκτικά με εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία (πειραματική σύγκλειση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας, ενδοεγκεφαλική-ενδοκοιλιακή χορήγηση 10μg IL-1RA), ΚΕΚ (lateral fluid perfusion injury, ενδοεγκεφαλική-ενδοκοιλιακή χορήγηση 10μg IL-1RA), και χορήγηση αγωνιστών των υποδοχέων NMDA ή AMPA στο ραβδωτό σώμα (χορήγηση 5μg IL-1RA στο ραβδωτό σώμα).

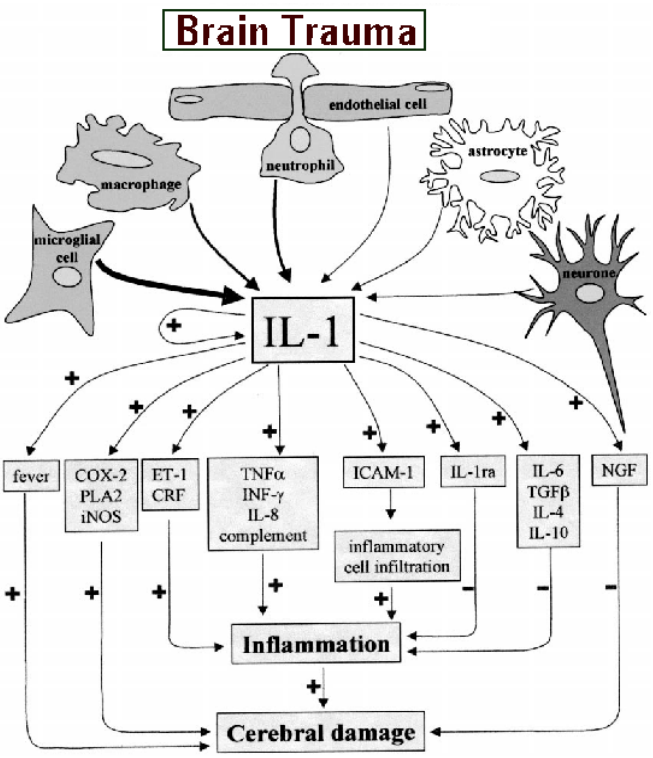
Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της IL-1 στην εγκεφαλική βλάβη

Είναι γνωστό ότι η φλεγμονώδης αντίδραση συμβάλλει στην παθογένεση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από κάκωση. Ωστόσο, η τοξική φύση πολλών προϊόντων της φλεγμονώδους αντίδρασης μπορεί να προκαλέσει σημαντική βλάβη στον εγκεφαλικό ιστό. Η IL-1β παίζει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδη αντίδραση μετά από εγκεφαλική ισχαιμία. Ένα χαρακτηριστικό της φλεγμονώδους αντίδρασης είναι η συσσώρευση λευκοκυττάρων, ιδιαίτερα ουδετερόφιλων, στον εγκέφαλο και παρατηρείται τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και στον άνθρωπο μετά από εστιακή εγκεφαλική βλάβη. Οι επιβλαβείς επιδράσεις των λευκοκυττάρων όπως η έμφραξη των τριχοειδών, η διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, η αγγειοσύσπαση και η απελευθέρωση κυτταροτοξικών ουσιών οδηγούν σε ανεπανόρθωτη βλάβη των νευρώνων [134].

Η μετακίνηση των λευκοκυττάρων προς την περιοχή της βλάβης διευκολύνεται από μόρια προσκόλλησης (π.χ. ICAM-1). Η έκφραση των μορίων αυτών επάγεται από την IL-1 μετά από εγκεφαλική βλάβη [135]. Επομένως, η IL-1β επιδεινώνει την εγκεφαλική βλάβη, αφού διευκολύνει μέσω των μορίων προσκόλλησης, τη διείσδυση των ουδετερόφιλων στον εγκέφαλο [136]. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται από τις ακόλουθες παρατηρήσεις: (1) στην εγκεφαλική ισχαιμία τα mRNA για την IL-1 και τα μόρια προσκόλλησης παράγονται στο ίδιο σχεδόν χρονικό διάστημα [96], (2) η χορήγηση αντισώματος για το ICAM-1 ή η έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί το ICAM-1 μειώνει σημαντικά τη βλάβη που προέρχεται από εγκεφαλική ισχαιμία [137, 138], και (3) έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση IL-1RA ή αντισώματος για την IL-1β μειώνει την έκφραση του ICAM-1, καθώς και τον αριθμό των ουδετερόφιλων στον εγκέφαλο μετά από ισχαιμία [108, 135, 139]. Επομένως, η έκφραση των μορίων προσκόλλησης πιθανόν να αποτελεί έναν μηχανισμό, μέσω του οποίου η IL-1 επιδεινώνει την εγκεφαλική βλάβη μετά από ισχαιμία.

Επίσης, η IL-1 επιδρά στη νευροδιαβίβαση, ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τη γλοία, επάγει τη σύνθεση μερικών αυξητικών παραγόντων, προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-6, TNFα, IFN-γ, IL-8, IL-1) καθώς και αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών (TGF-β, IL-10, IL-4, IL-1RA) [140]. Επίσης, μεσολαβεί στην απελευθέρωση άλλων φλεγμονωδών μεταβολιτών ή ενζύμων όπως προσταγλανδίνες, κολλαγενάση και φωσφολιπάση A_2.

Ωστόσο, δύο παράγοντες παρεμποδίζουν τη μελέτη του μηχανισμού δράσης της IL-1 στον εγκέφαλο. Πρώτον, έχει παρατηρηθεί ότι η IL-1 δεν είναι νευροτοξική in vivo απουσία άλλων κακώσεων και δεύτερον, οι επιδράσεις της IL-1 ή της IL-1RA στην νευρωνική απόπτωση in vivo δεν παρατηρούνται σε in vitro πειράματα. Για παράδειγμα, κατά τη χορήγηση τοξικών ουσιών σε καλλιέργεια νευρώνων, η IL-1 προστατεύει τους νευρώνες πιθανόν μέσω επαγωγής του NGF (nerve growth factor) [141], γεγονός που δεν παρατηρείται μετά από χορήγηση IL-1RA [110]. Επομένως, η IL-1 πιθανόν να επιδρά στη νευρωνική επιβίωση [142] ή θάνατο [143] μέσω περίπλοκων μηχανισμών και της συμμετοχής διάφορων τύπων νευρικών κυττάρων [78, 144]. Έτσι, τα κύτταρα της γλοίας μπορούν να παράγουν και να αποκριθούν σε μια ποικιλία κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων [145-147]. Επίσης, τα αστροκύτταρα συμμετέχουν στην επούλωση τραυμάτων επάγοντας την έκκριση νευροτροφικών παραγόντων [148] μετά από εγκεφαλική βλάβη [149, 150]. Η μικρογλοία ρυθμίζει τη νευρωνική επιβίωση [151] και επάγει την κυτταροτοξικότητα μέσω παραγωγής ελεύθερων ριζών, σύνθεσης του NO και ενεργοποίησης του NMDA υποδοχέα [152]. Επομένως, 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 κάκωση.



Εικόνα: Απεικόνιση των πιθανών άλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην IL-1 και άλλες φλεγμονώδεις ουσίες, αυξητικούς παράγοντες και μόρια προσκόλλησης. COX-2: cyclo-oxygenase 2, PLA2: phospholipase A2, iNOS: inducible NO synthase, ET-1: endothelin 1, CRF: corticotropin releasing factor, TNFa: tumor necrosis factor, INFg: interferon gamma, ICAM-1: intercellular cell adhesion molecule 1, IL-1RA: interleukin-1 Receptor Antagonist, IL-6: interleukin-6, TGFβ: transforming growth factor, IL-4: interleukin-4, IL-10: interleukin-10, NGF: nervous growth factor.

Επιδράσεις της IL-1 στη θερμοκρασία του εγκεφάλου

Η IL-1β είναι μια ισχυρή πυρετογόνος ουσία που δρα στον υποθάλαμο και επάγει τον πυρετό μέσω απελευθέρωσης προσταγλανδινών [153]. Επίσης, είναι γνωστό 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 (5ng) σε πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν σύγκλειση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας επιδεινώνει τη βλάβη του εγκεφάλου και προκαλεί μια σημαντική αύξηση στη θερμοκρασία του σώματος [104]. Αντίθετα, η χορήγηση IL-1β εντός του ραβδωτού σώματος (2.5ng) καταλήγει σε βλάβη του ραβδωτού σώματος και του φλοιού, χωρίς να προκαλεί αλλαγές στη θερμοκρασία του σώματος [154]. Αυτό φανερώνει ότι η επιδείνωση της εγκεφαλικής βλάβης που επάγεται από την IL-1β είναι ανεξάρτητη από την αλλαγή στη θερμοκρασία του σώματος. Παρόλα αυτά, η IL-1 πιθανόν να επηρεάζει τη βλάβη του ΚΝΣ μέσω τοπικών επιδράσεων στη θερμοκρασία ανάλογα με την εντόπιση στον εγκέφαλο.

Παρόμοια, η χορήγηση IL-1RA ή παραγόντων που αναστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου ICE μειώνει την βλάβη του εγκεφάλου μετά από ισχαιμία, χωρίς να προκαλεί αλλαγές στη θερμοκρασία του σώματος ή τις καρδιαγγειακές λειτουργίες [111, 115, 155]. Παρόλα αυτά, είναι πιθανόν η δράση της IL-1RA ή η αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου ICE να επηρεάζει τη θερμοκρασία του σώματος.

Επιδράσεις της IL-1 στην αιματική ροή του εγκεφάλου

Μία πιθανή επίδραση της IL-1β στην αιματική ροή του εγκεφάλου (CBF:cerebral blood flow) υποστηρίζεται από μελέτες που φανερώνουν ότι η κυτοκίνη αυτή εκφράζεται στα εγκεφαλικά αγγεία μετά από εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία [156]. Επίσης, η IL-1β εκφράζεται στα αστροκύτταρα που βρίσκονται στα παρεγχυματώδη αιματικά αγγεία και τα περιαγγειακά μακροφάγα [97]. Σε πειραματικά μοντέλα βρέθηκε ότι η IL-1β αυξάνει τα επίπεδα προστανοειδών (προϊόντα δράσης κυκλοξυγενάσης) και προκαλεί τη διαστολή των μεσεντέριων, χοριοειδών και βασικών αρτηριών [157, 158]. Ωστόσο, η IL-1β ενισχύει την παραγωγή ενδοθηλίνης (πρωτεΐνη υπεύθυνη για τη συστολή των αγγείων) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [159]. Επομένως, η IL-1β πιθανόν να επάγει την έκφραση ουσιών που τροποποιούν τη δραστηριότητα των αγγείων του εγκεφάλου και να επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα την αιματική ροή του εγκεφάλου.

Αντίθετα, μελέτες φανερώνουν ότι η αιματική ροή του εγκεφάλου δεν επηρεάζεται σε πειραματικά μοντέλα που υπερεκφράζουν το γονίδιο της IL-1RA ή σε μοντέλα με έλλειψη του γονιδίου για το ένζυμο ICE. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει επειδή η IL-1RA ή η αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου ICE βελτιώνουν την εγκεφαλική βλάβη μετά από ισχαιμία [160].

Άλλες επιδράσεις της IL-1

Η δράση της IL-1β στην παθογένεση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από κάκωση περιλαμβάνει την αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων Ca^{2+} [161], την παραγωγή ελεύθερων ριζών [162], την ενεργοποίηση του ενζύμου iNOs (inducible nitric oxide synthase) και τη σύνθεση του NO [163], την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος [164] και του CRF (corticotropin releasing factor) [165], την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και του β-αμυλοειδούς [166, 167], καθώς και την ενεργοποίηση της μικρογλοίας [168]. Ωστόσο, η IL-1 συνεισφέρει και στη βελτίωση της εγκεφαλικής βλάβης που προκαλείται από κάκωση. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλει την είσοδο στα κύτταρα του Ca^{2+}, ενισχύει τη δραστηριότητα των GABA υποδοχέων, ενεργοποιεί τη σύνθεση νευροτροφικών παραγόντων που πιθανόν να προστατεύουν τους νευρώνες. Επομένως, τα αποτελέσματα της IL-1 πιθανόν να εξαρτώνται από την περιοχή δράσης της και τη συγκέντρωσή της. Έτσι, η IL-1 ενεργοποιεί διαφορετικά ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ενισχύουν ή περιορίζουν τον κυτταρικό θάνατο των νευρωνικών πληθυσμών [78].

IL-1 και χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση

Η έκφραση της IL-1 στον εγκεφαλικό ιστό αυξάνεται δραματικά σε πολλές χρόνιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, η επιληψία, η νόσος του Parkinson, το σύνδρομο Down και η ασθένεια των κινητήριων νευρώνων.

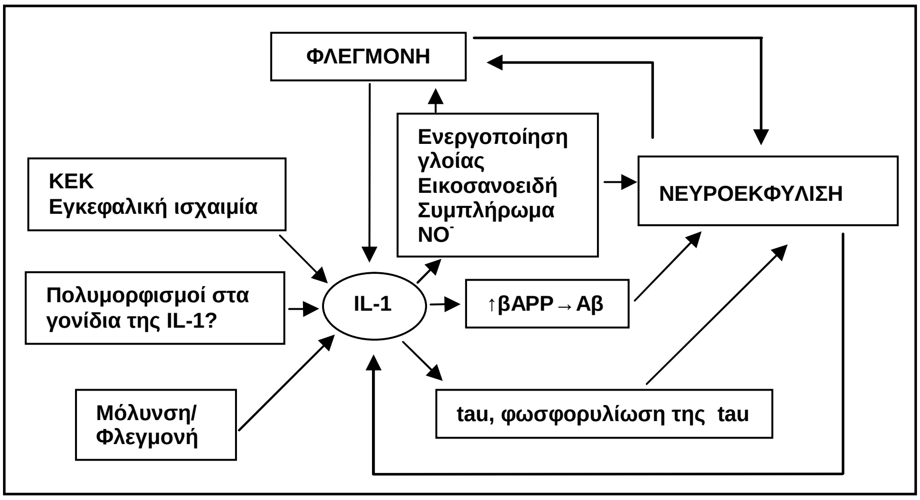
Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η δράση της IL-1 σχετίζεται με τη νόσο του Alzheimer. Πιο συγκεκριμένα, η IL-1 επάγει την ενεργοποίηση της γλοίας, την έκφραση φλεγμονωδών μορίων και τη διείσδυση ανοσοποιητικών κυττάρων εντός του ΚΝΣ [55, 169]. Από μελέτες σε ασθενείς με νόσο Alzheimer (AD) βρέθηκε ότι η IL-1 ενεργοποιεί την έκφραση της βAPP πρωτεΐνης [170] (β amyloid precursor protein) που αποτελεί πρόδρομο μόριο του β-αμυλοειδούς (Aβ) και συνεισφέρει στο σχηματισμό των αμυλοειδικών πλακών της νόσου. Επίσης, η IL-1 επάγει την έκφραση και τη φωσφορυλίωση της tau πρωτεΐνης [171] (πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού) που συμμετέχει στο νευροεκφυλισμό.

Πρόσφατες μελέτες φανερώνουν ότι οι πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν για την IL-1 (IL-1α και IL-1β) πιθανόν να είναι υπεύθυνοι για την πρώιμη έναρξη της νόσου του Alzheimer [172, 173]. Μάλιστα, τα άτομα με πολυμορφισμούς στο γονίδιο της IL-1β παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν AD. Ωστόσο, αυτό πιθανό να σχετίζεται με άλλες αλλαγές στην αλληλουχία γειτονικών γονιδίων. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί παρατηρούνται σε μη-κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου της IL-1. Για το λόγο αυτό, η επίδραση των πολυμορφισμών αυτών στην έκφραση της IL-1 θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

ΚΕΚ και χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση

Η έκφραση και η δράση της IL-1 στον εγκεφαλικό ιστό θα μπορούσε να εξηγήσει, τουλάχιστον εν μέρει, τη σύνδεση της εγκεφαλικής κάκωσης και της νόσου του Alzheimer (AD) [174]. Πιο συγκεκριμένα, η εγκεφαλική κάκωση επάγει την έκφραση της IL-1β στον εγκεφαλικό ιστό ασθενών [175] αλλά και πειραματικών μοντέλων [169]. Η IL-1 πιθανόν να ενεργοποιεί τη χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση και τη χρόνια νευροεκφύλιση που σχετίζεται με την AD. Έτσι, γνωρίζοντας τους κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς της AD και της εγκεφαλικής κάκωσης μπορούμε να υποθέσουμε ότι η οξεία ή επιμένουσα φλεγμονώδης αντίδραση μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση πιθανό να είναι μια από τις αιτίες της εναπόθεσης Αβ αμυλοειδούς, της χρόνιας νευροεκφύλισης και της σύνδεσης των δύο νόσων.

Πράγματι σε μελέτες αρουραίων [176] που υπέστησαν εγκεφαλικό τραύμα έχει ανιχνευτεί επιμένουσα φλεγμονώδης αντίδραση 3 μήνες μετά το τραύμα, καθώς και αυξημένη έκφραση της βAPP και της tau πρωτεΐνης [177] αρκετούς μήνες μετά το τραύμα. Επίσης, σε μελέτες πειραματικών μοντέλων που υπέστησαν οξεία εγκεφαλική βλάβη έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση IL-1RA αναστέλλει την επαγωγή της βAPP πρωτεΐνης.



Εικόνα: Ο ρόλος της IL-1 στη χρόνια νευροεκφύλιση. Η IL-1 όπως και η apoE εμπλέκονται με παρόμοιους παθογενετικούς μηχανισμούς στη νευρωνική βλάβη.

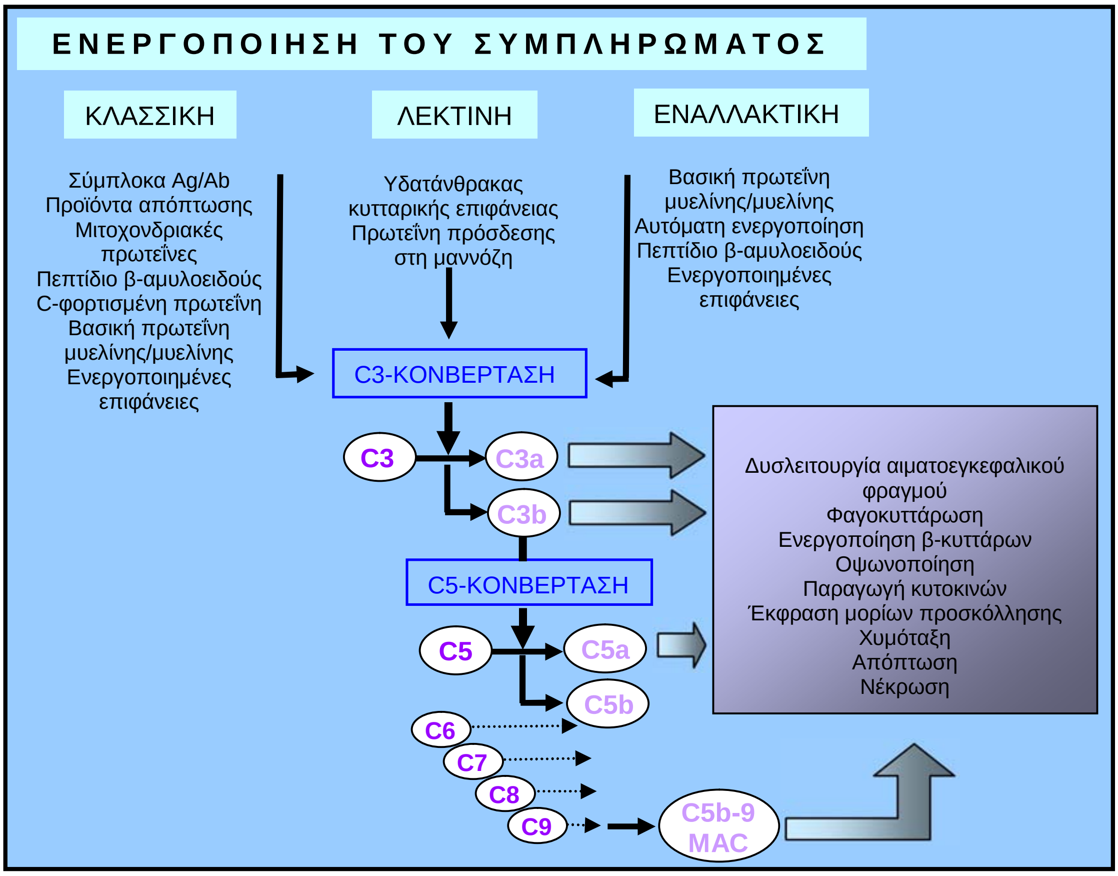
Επιδράσεις της IL-6 μετά από ΚΕΚ

Μελέτες σε ασθενείς, πειραματικά μοντέλα και κυτταρικές καλλιέργειες φανερώνουν ότι η IL-6 παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση που επάγεται από ΚΕΚ. Συγκεκριμένα, η IL-6 είναι υπεύθυνη για την επιδείνωση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ, αφού συνεισφέρει στον κυτταρικό θάνατο των νευρωνικών πληθυσμών και επάγει την ενεργοποίηση της γλοίας. Αυτό συχνά έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τη διείσδυση μονοπύρηνων κυττάρων στο σημείο της εγκεφαλικής βλάβης. Επίσης, η IL-6 είναι μια ενδογενής πυρετογόνος ουσία [178]. Έχει βρεθεί ότι η τοπική παραγωγή της κυτοκίνης αυτής στον υποθάλαμο (μέσω IL-1β, TNF-α) [179, 180] ενεργοποιεί τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA axis: hypothalamic-pituitary-adrenal axis), ρυθμίζοντας σημαντικές λειτουργίες, όπως τον πυρετό, τον ύπνο και την πρόσληψη της τροφής.

Ωστόσο, μελέτες φανερώνουν ότι η IL-6 μπορεί να δράσει και ως μια αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη, εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση, το χρόνο και την περιοχή έκφρασής της. Έτσι, η κυτοκίνη αυτή αναστέλλει τη σύνθεση του TNF (tumor necrosis factor, προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη), επάγει τη σύνθεση του NGF (nerve growth factor), προάγει την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και επιβίωση των νευρικών κυττάρων και εξουδετερώνει την τοξικότητα της δράσης του NMDA (N-methyl-D-aspartate) νευροδιαβιβαστή [57]. Επίσης, η έκφραση της IL-6 και του υποδοχέα της στον εγκεφαλικό ιστό φυσιολογικών ατόμων φανερώνει ότι η κυτοκίνη αυτή συμβάλλει στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του ΚΝΣ, ανεξάρτητα από τη νευροπαθοφυσιολογία του.

Ενεργοποίηση του συμπληρώματος στον ενδοκράνιο χώρο

Το συμπλήρωμα παίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, προστατεύοντας ενάντια στη βλάβη των ιστών ή τη μόλυνση. Η παραγωγή των πρωτεολυτικών συστατικών του συμπληρώματος οδηγεί σε διάφορες φλεγμονώδεις επιδράσεις, όπως οψωνοποίηση διαφόρων αντιγόνων, αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων, συγκέντρωση φαγοκυττάρων, ενεργοποίηση των Β-κυττάρων, και κυτταρόλυση των παθογόνων μέσω του τελικού μονοπατιού μεταγωγής σήματος του συμπληρώματος [181, 182]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι κύτταρα του ΚΝΣ, όπως οι νευρώνες και τα αστροκύτταρα, εκφράζουν τόσο τις πρωτεΐνες ενεργοποίησης του συμπληρώματος όσο και τους υποδοχείς του [183, 184]. Επίσης, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος συνεισφέρει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ, όπως νευροεκφυλιστικά, αυτοάνοσα και λοιμώδη νοσήματα [185-188]. Διάφορες κλινικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι το συμπλήρωμα συμβάλλει στην παθοφυσιολογία της δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ [189]. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος προκαλεί τη συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων στο ΕΝΥ [190, 191], τη δυσλειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (μέσω των αναφυλατοξινών C3a και C5a), την απόπτωση των νευρωνικών πληθυσμών (μέσω του C5a receptor-C5aR υποδοχέα που εκφράζεται στους νευρώνες), και την κυτταρόλυση (μέσω του MAC: membrane attack complex/C5b-9), με συνέπεια την απενεργοποίηση των μηχανισμών προστασίας των κυττάρων ενάντια στο συμπλήρωμα [192-194]. Τέλος, σε ασθενείς που υπέστησαν ΚΕΚ ανιχνεύτηκαν διάφορα ενεργοποιημένα συστατικά του συμπληρώματος κατά τη μετατραυματική περίοδο, τα οποία πιθανό να συνεισφέρουν στη βλάβη του εγκεφαλικού ιστού που ακολουθεί την κάκωση [58, 195].



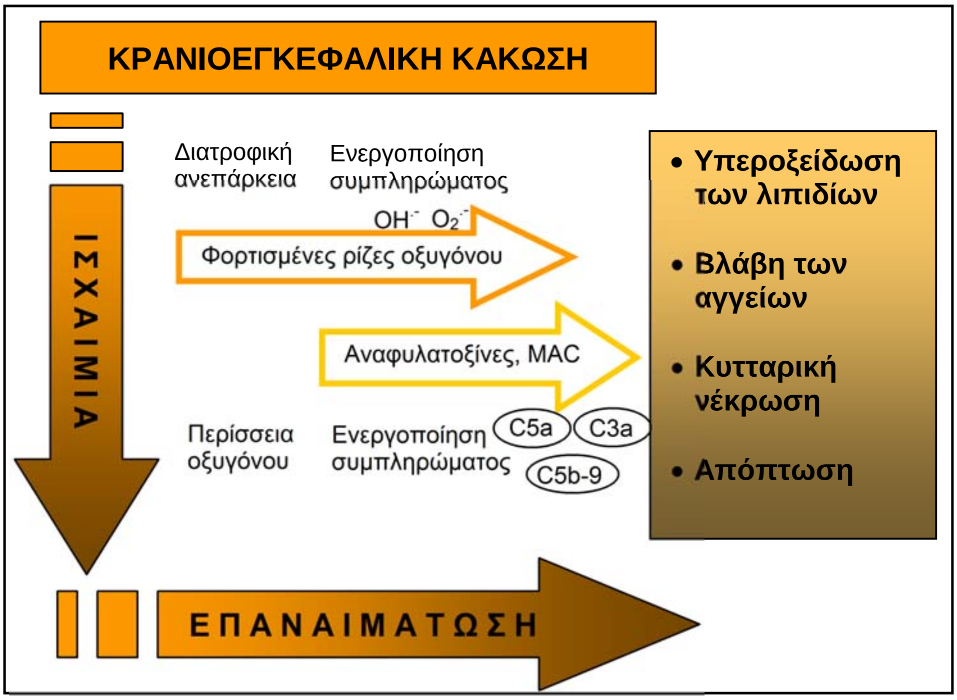
Εικόνα: Μονοπάτια ενεργοποίησης του συμπληρώματος και μηχανισμοί επαγωγής φλεγμονώδους αντίδρασης στο ΚΝΣ και δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ. MAC: membrane attack complex. Η διάσπαση του C3 συστατικού από τη C3 κονβερτάση οδηγεί στο σχηματισμό του C3b συστατικού και ενός μικρού πεπτιδίου,

της αναφυλατοξίνης C3a, η οποία εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των κυττάρων και την χυμική απόκριση κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης. Η βιολογική δράση του C3a συστατικού διευκολύνεται μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον C3a υποδοχέα (C3a receptor:C3aR). Η αναφυλατοξίνη C5a προέρχεται από την πρωτεολυτική διάσπαση του C5 συστατικού μέσω της C5 κονβερτάσης. Η βιολογική δράση του C5a συστατικού διευκολύνεται μέσω της σύνδεσής του με τον C5a υποδοχέα (C5a receptor: C5aR). Στο ΚΝΣ, η αναφυλατοξίνη C5a προκαλεί τη διήθηση των ουδετερόφιλων κατά μήκος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, τη χυμική απόκριση της γλοίας, την τροποποίηση των νευρωνικών λειτουργιών στον υποθάλαμο, την ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα αστροκύτταρα και τους νευρώνες.

Μετατραυματική Ισχαιμία-Βλάβες λόγω επαναιμάτωσης και οξειδωτικού stress

Οι βλάβες λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και το οξειδωτικό stress συμβάλλουν στην ενδοεγκεφαλική φλεγμονώδη αντίδραση και την καθυστερημένη δευτεροπαθή εγκεφαλική βλάβη μετά από ΚΕΚ [50, 196, 197]. Παθοφυσιολογικά, οι περιοχές του εγκεφάλου που υπέστησαν θλάση χαρακτηρίζονται από μειωμένη αιματική ροή, τοπική ισχαιμία λόγω βλάβης των αγγείων, απώλεια αυτορύθμισης των αγγείων του εγκεφάλου, και συστηματική υπόταση. Μετά τα αρχικά στάδια της ΚΕΚ, οι εγκεφαλικές αυτές περιοχές επαναιματώνονται, με συνέπεια την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και των ενδιαμέσων του ενεργού οξυγόνου (reactive oxygen intermediates) [198]. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών προκαλεί την παραγωγή βιολογικά ενεργών μορίων, τα οποία προωθούν την εξαγγείωση των λευκοκυττάρων και την δευτεροπαθή βλάβη του εγκεφαλικού ιστού. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, όπως τα ιόντα υδροξυλίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, και τα ανιόντα υπεροξειδίου, επάγουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων, την αποικοδόμηση της κυτταρικής μεμβράνης, και τον καθυστερημένο θάνατο των νευρωνικών πληθυσμών.

Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν ΚΕΚ φανερώνουν ότι το οξειδωτικό stress παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης [199-201]. Επίσης, ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά του εγκεφάλου, όπως το υψηλό κλάσμα μεμβράνης/κυτταρόπλασμα και τα υψηλά επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο ΚΝΣ, αυξάνουν την ευαισθησία του στο οξειδωτικό stress και την υπεροξείδωση των λιπιδίων [197]. Γνωστοί ενδογενείς αντιοξειδωτικοί παράγοντες του εγκεφάλου είναι η υπεροξειδική δισμουτάση και ορισμένα χαμηλού ΜΒ μόρια, όπως η α-τοκοφερόλη. Μελέτες φανερώνουν ότι παρατηρείται μια μείωση στα επίπεδα των αντιοξειδωτικών μορίων στον εγκέφαλο πειραματικών μοντέλων που υπέστησαν ΚΕΚ [200, 202]. Επίσης, σε κλινικές μελέτες έχει ανιχνευτεί μείωση στη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών συστατικών στο ανθρώπινο ΕΝΥ μετά από ΚΕΚ [203].



Εικόνα 7: Ρόλος των βλαβών λόγω ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στη δευτεροπαθή εγκεφαλική βλάβη μετά από ΚΕΚ. Το εγκεφαλικό τραύμα οδηγεί σε ισχαιμία στο σημείο της πρόσκρουσης και σε τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Η ισχαιμία επάγει τη τροφική ανεπάρκεια (nutritive failure) και τη μείωση των ενεργειακών επιπέδων (ATP: adenosine triphosphate), με συνέπεια την παραγωγή ενδιαμέσων του ενεργού οξυγόνου. Κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, παράγονται φορτισμένες ρίζες οξυγόνου με νευροτοξικές ιδιότητες, όπως ανιόντα υπεροξειδίου και υδροξυλίου. Επίσης, η επαναιμάτωση συμβάλλει στην εισροή ενεργοποιημένων συστατικών του συμπληρώματος, όπως οι αναφυλατοξίνες C3a και C5a, και το σύμπλοκο MAC (membrane attack complex)/C5b-9. Γενικά, οι βλάβες λόγω ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης συμβάλλουν στη δευτεροπαθή εγκεφαλική βλάβη μέσω επαγωγής της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, της βλάβης των αγγείων, της κυτταρικής νέκρωσης και της απόπτωσης.

Θεραπευτικές προεκτάσεις

IL-1

Είναι γνωστό ότι προς το παρών δεν υπάρχει ευρέως διαθέσιμη και αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή για την κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Ποικίλες κλινικές δοκιμές νευροπροστατευτικών παραγόντων δεν ήταν αποτελεσματικές και προκαλούσαν ανεπιθύμητες παρενέργειες. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει επειδή οι μελέτες σε μοντέλα τρωκτικών είναι πιο απλές σε σύγκριση με τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του τραύματος στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Επίσης, η αποτυχία των κλινικών αυτών δοκιμών πιθανόν να οφείλεται σε ανεπαρκή προκλινική εικόνα των διάφορων πειραματικών μοντέλων και σε σφάλματα σχεδίασης ή σε περιορισμούς των κλινικών δοκιμών. Οι περισσότερες θεραπευτικές αγωγές παρεμβαίνουν σε διαδικασίες που υπερενεργοποιούνται στον ανθρώπινο εγκέφαλο μετά από κάκωση και ταυτόχρονα παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου (γλουταμινεργικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος, ομοιόσταση Ca^{2+}, σύνθεση του NO). Για το λόγο αυτό, τέτοιου είδους θεραπευτικές αγωγές οδηγούν σε ανεπιθύμητες παρενέργειες.

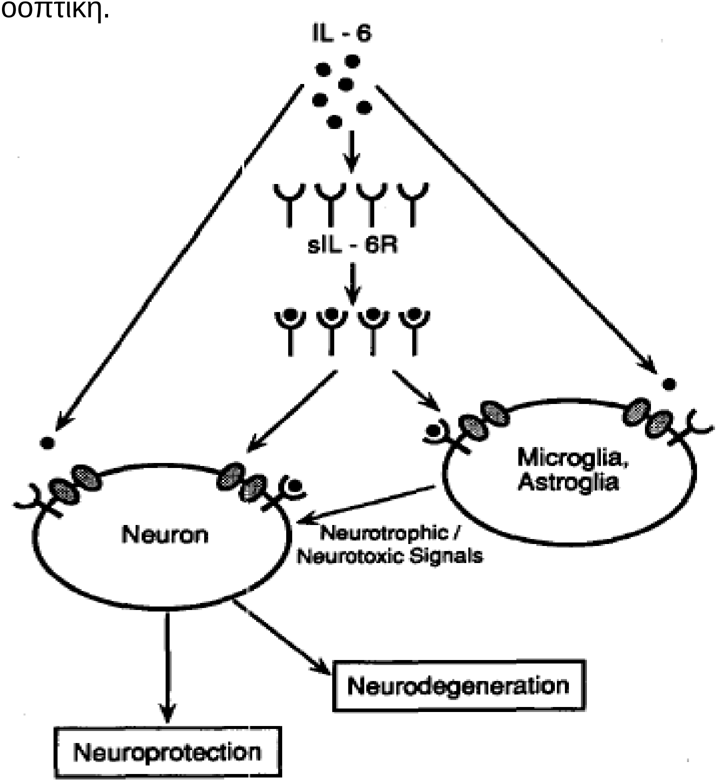
Από την άλλη πλευρά, οι κυτοκίνες (IL-1) δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου. Επομένως, η αναστολή της τοξικής δράσης τους στον ανθρώπινο εγκέφαλο που υπέστη κάκωση αποτελεί μια επιτυχή θεραπευτική προσέγγιση. Η IL-1RA μειώνει το μέγεθος της βλάβης που προκαλείται από ισχαιμική, τοξική, τραυματική ή φλεγμονώδη εγκεφαλική κάκωση. Επίσης, μειώνει το οίδημα ενισχύει την επιβίωση των νευρωνικών πληθυσμών, και αναστέλλει την ενεργοποίηση της γλοίας και τη διείσδυση των περιφερικών ανοσοποιητικών κυττάρων στο σημείο του τραύματος. Μερικές άλλες δραστηριότητες της IL-1RA, όπως η αναστολή του πυρετού και της αδιαθεσίας (π.χ. απώλεια της όρεξης) και η αναλγησία πιθανόν να συνεισφέρουν στη θεραπεία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Η IL-1RA είναι αποτελεσματική (αν και σε υψηλές συγκεντρώσεις) όταν χορηγείται ενδοεγκεφαλικά, ενδοκοιλιακά και περιφερικά (φλεβική αιματική κυκλοφορία), αλλά ακόμα και όταν χορηγείται 8-12h μετά το εγκεφαλικό τραύμα [204]. Δεν είναι τοξική όταν χορηγείται σε πειραματικά μοντέλα ή τον άνθρωπο μετά από τραύμα και προκαλεί ελάχιστες έως μηδαμινές ανεπιθύμητες παρενέργειες. Ωστόσο, η έρευνα στρέφει το ενδιαφέρον της στο σχεδιασμό μικρών, μη-πεπτιδικών παραγόντων που θα παρεμβαίνουν στη βιοσύνθεση, τη διάσπαση καθώς και σε άλλες τοξικές δράσεις της IL-1.

IL-6

Έχει βρεθεί ότι η IL-6 ασκεί τη δράση της, ενεργοποιώντας διαφορετικά ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Είναι πιθανόν να επιδρά στους νευρώνες άμεσα ή έμμεσα, μέσω μη-νευρικών κυττάρων. Τα μονοπάτια αυτά μπορούν να τροποποιηθούν από τους διαλυτούς υποδοχείς της IL-6 (sIL-6R), οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη δράση της IL-6. Έτσι, είναι πιθανόν η τοπική χορήγηση sIL-6R σε συνδυασμό με IL-6 να συνεισφέρει στην αναγέννηση των νευρωνικών πληθυσμών. Επίσης, η χρήση ανταγωνιστών του υποδοχέα της IL-6 [205, 206] και αντισωμάτων [207, 208] που αναστέλλουν τη δράση συστατικών του λειτουργικού υποδοχέα της IL-6 είναι ουσιαστικής σημασίας σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες καθώς και στη φλεγμονώδη αντίδραση του ΚΝΣ. Σε παθολογικές καταστάσεις που ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα IL-6, η άμεση ή έμμεση παρέμβαση στη βιοσύνθεση της IL-6 θα αποτελούσε μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση.

Ωστόσο, το αυξημένο μέγεθος των υποψήφιων θεραπευτικών παραγόντων δυσκολεύει την προσέγγιση της εγκεφαλικής βλάβης. Η συστηματική χορήγηση των παραγόντων αυτών δεν ενδείκνυται, διότι η ευρεία δράση της IL-6 οδηγεί σε ανεπιθύμητες παρενέργειες. Η τοπική χορήγηση των θεραπευτικών παραγόντων θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση μικρο-οσμωτικών αντλιών, γενετικά τροποποιημένων κυττάρων και μορίων-φορέων βραδείας απελευθέρωσης. Επίσης, η παρασκευή μορίων χαμηλού μοριακού βάρους που θα παρεμβαίνουν εξειδικευμένα στη δραστηριότητα της IL-6 αποτελεί μια μελλοντική προοπτική.



Εικόνα: Δράση της IL-6. Η IL-6 επιδρά στους νευρώνες άμεσα ή έμμεσα, μέσω μη-νευρικών κυττάρων, όπως τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία. Τα μη-νευρικά κύτταρα επάγουν δευτερεύοντα σήματα (νευροτροφικά ή νευροτοξικά). Με τον τρόπο αυτό, η IL-6 προστατεύει τους νευρώνες από εγκεφαλική κάκωση ή είναι νευροτοξική, προκαλώντας νευροεκφύλιση και κυτταρικό θάνατο. Οι νευροτοξικές επιδράσεις της IL-6 μπορούν να τροποποιηθούν με τη χορήγηση συμπλόκου IL-6/sIL-6R.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΚΕΚ

Εισαγωγή

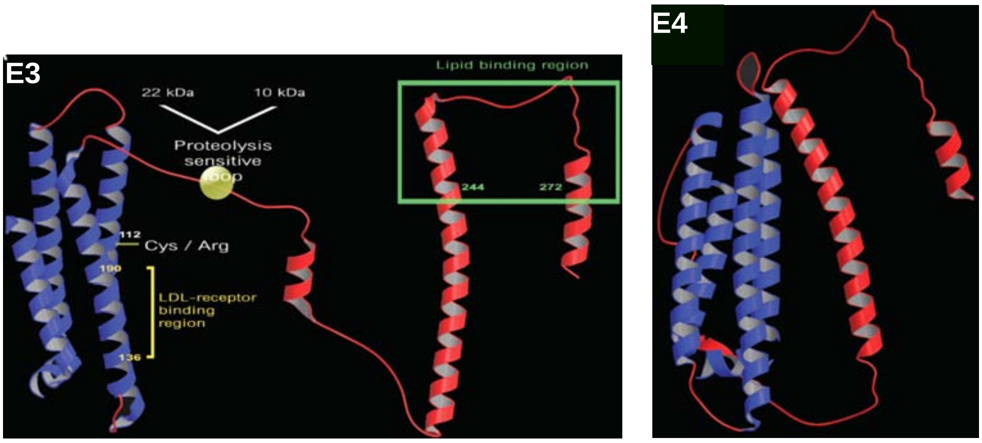
Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μια πληθώρα μελετών σε ασθενείς με ΚΕΚ, οι οποίες αφορούν κυρίως στη διερεύνηση της επίδρασης πολυμορφισμών διάφορων γονιδίων στην πρόγνωση μετά από εγκεφαλική βλάβη. Οι μελέτες αυτές συγκλίνουν στην αναγνώριση της απολιποπρωτεΐνης Ε ως σημαντικό παράγοντα για την έκβαση μετά από εγκεφαλική κάκωση. Ωστόσο, και άλλα γονίδια, όπως το COMT γονίδιο (catechol-o-methyltransferase),το γονίδιο της neprilysin, το DRD2 γονίδιο (dopamine D2 receptor), τα γονίδια των ιντερλευκινών, το p53 γονίδιο, το ACE γονίδιο και το CACNA1A γονίδιο είναι πιθανό να επηρεάζουν την έκβαση μετά από ΚΕΚ.

Απολιποπρωτεΐνη Ε (ApoE)

Γενετική έκφραση της apoE

Το APOE γονίδιο έχει μήκος 3.7Kb, αποτελείται από 4 εξόνια και έχει χαρτογραφηθεί στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 19 [209]. Η apoE είναι μια πρωτεΐνη (ΜΒ=34KDa) που αποτελείται από 299 αμινοξέα και έχει κύριο ρυθμιστικό ρόλο στη μεταφορά και το μεταβολισμό των λιπιδίων [210]. Στον άνθρωπο υπάρχουν 3 ισομορφές της apoE: E2, E3 και E4 που κωδικοποιούνται από 3 διαφορετικά αλλήλια: ε2, ε3 και ε4. Τα τρία αυτά αλλήλια διαφέρουν στο συνδυασμό της κυστεΐνης (cys) και της αργινίνης (arg) στις θέσεις 112 και 158 εντός της αλληλουχίας των αμινοξέων. Έτσι, το ε2 αλλήλιο περιέχει cys^{112}cys^{158}, το ε3 αλλήλιο περιέχει cys^{112}arg^{158} ενώ το ε4 αλλήλιο περιέχει arg^{112} arg^{158}. Οι ισομορφές της apoE εμφανίζονται με συχνότητα 7% (ε2), 78% (ε3) και 15% (ε4) στον γενικό πληθυσμό [211]. Ένα άτομο μπορεί να έχει έναν από τους έξι πιθανούς APOE γονοτύπους: υπάρχουν 3 ομόζυγοι γονότυποι (APOE 2/2, APOE 3/3, APOE 4/4) και 3 ετερόζυγοι γονότυποι (APOE 2/3, APOE 3/4, APOE 2/4). Οι πιο συχνοί γονότυποι στο γενικό πληθυσμό είναι οι APOE 2/3, APOE 3/3, και APOE 3/4.

Έχει βρεθεί ότι το ε4 αλλήλιο αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για τη σποραδική και οικογενή νόσο Alzheimer (AD) [212-214], την εμφάνιση αυτόματης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας [215] και ισχαιμικού ΑΕΕ [216], ενώ έχει συσχετισθεί επίσης με βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου και με κακή πρόγνωση μετά από εγκεφαλική κάκωση [217, 218].



Εικόνα: Δομή των Ε3 και Ε4 ισομορφών της apoE πρωτεΐνης.

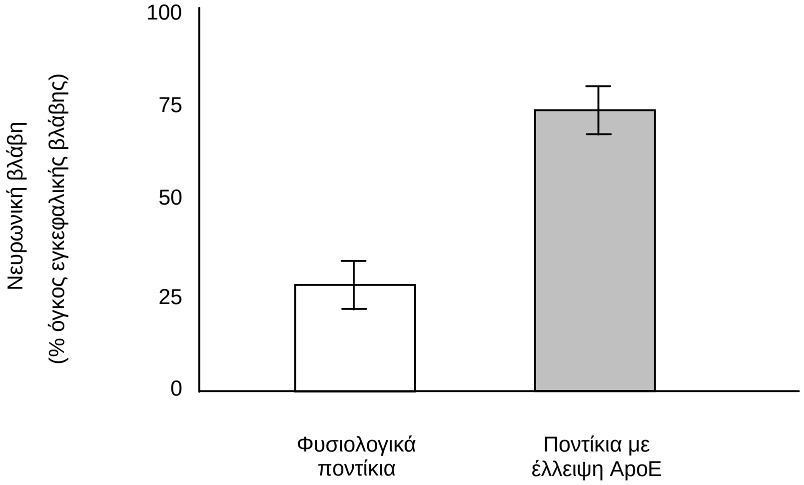
Σύνθεση της apoE

Στο ΚΝΣ, η apoE συντίθεται κυρίως στα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία. Είναι μια σφαιρική, δισκοειδής λιποπρωτεΐνη, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων. Μετά τη σύνθεσή της συνδέεται με χοληστερόλη και φωσφολιπίδια, σχηματίζοντας σύμπλοκα πρωτεΐνης-λιπιδίων, τα οποία απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς της apoE, που βρίσκονται στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων και εισέρχονται στο εσωτερικό τους. Η apoE εντός του νευρικού κυττάρου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση και επιδιόρθωση των κυτταρικών μεμβρανών, την ανάπτυξη των νευριτών και τη δημιουργία νέων συνάψεων [219], και κατ’ επέκταση τη λειτουργία και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων.

Στο ανθρώπινο εγκεφαλονωτιαίο υγρό η apoE είναι η μοναδική απολιποπρωτεΐνη που ανιχνεύεται. Σε αντίθεση με το πλάσμα, όπου η apoB που περιέχει LDL (low density lipoprotein) είναι η κύρια λιποπρωτεΐνη που συμβάλλει στη μεταφορά των λιπιδίων, το ΕΝΥ στερείται apoB και LDL, με αποτέλεσμα η apoE να παίζει κύριο ρόλο στη μεταφορά των λιπιδίων.

Βιολογικός ρόλος της apoE

Η apoE είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των λιπιδίων εντός του εγκεφάλου, τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των μικροσωληνίσκων εντός του νευρώνα και τη δημιουργία νευρικών συνάψεων [220]. Από σειρά μελετών σε πειραματόζωα φαίνεται ότι η apoE έχει νευροπροστατευτική δράση και μειώνει το μέγεθος της νευρωνικής βλάβης μετά από εγκεφαλική κάκωση. Ποντίκια με έλλειψη του APOE γονιδίου παρουσιάζουν τουλάχιστον διπλάσια νευρωνική βλάβη σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου [221], ενώ η ενδοεγκεφαλική-ενδοκοιλιακή χορήγηση apoE μειώνει την έκταση της βλάβης [222].



Εικόνα: Ποσοτικοποίηση του μεγέθους της νευρωνικής βλάβης στον κερκοφόρο πυρήνα μετά από παροδική σφαιρική ισχαιμία σε ποντίκια που στερούνται του APOE γονιδίου σε σύγκριση με φυσιολογικά ποντίκια.

Επίσης, διαγονιδιακά μοντέλα που υπερεκφράζουν την E4 ισομορφή παρουσιάζουν διπλάσια νευρωνική βλάβη μετά από εγκεφαλική κάκωση σε σχέση με τις άλλες ισομορφές.

Πολυμορφισμός της apoE και ΚΕΚ

Μια μετα-ανάλυση μελετών που αφορούσαν ασθενείς με ΚΕΚ έδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ ιστορικού ΚΕΚ και AD [223]. Επίσης, βρέθηκαν εναποθέσεις Αβ αμυλοειδούς στον εγκέφαλο περίπου στο 30% των ασθενών που πέθαιναν στην οξεία φάση μετά από ΚΕΚ [224]. Έτσι, η διερεύνηση της σχέσης του πολυμορφισμού της apoE και του εγκεφαλικού τραύματος προέκυψε έμμεσα λόγου της φανερής σύνδεσης της ΚΕΚ με την AD και του ήδη γνωστού ρόλου της apoE στην ανάπτυξη γεροντικών πλακών στην AD. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με APOE ε4 που πέθαιναν από εγκεφαλική κάκωση είχαν 4 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν Αβ εναποθέσεις σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς το ε4 αλλήλιο [225].

Πολλές μελέτες κατόπιν έδειξαν ότι ασθενείς με APOE ε4 έχουν περισσότερες πιθανότητες για δυσμενή πρόγνωση μετά από ΚΕΚ. Σε πρώτη προοπτική μελέτη [218] ασθενών με ΚΕΚ (n=93) βρέθηκε ότι το 57% των ασθενών με ε4 αλλήλιο είχαν δυσμενή πρόγνωση (θάνατος, φυτική κατάσταση, βαριά αναπηρία σύμφωνα με την κλίμακα έκβασης της Γλασκόβης) 6 μήνες μετά την κάκωση σε σχέση με το 27% των ασθενών χωρίς το ε4 με κακή επίσης πρόγνωση. Αυτή η στατιστική σημαντικότητα διατηρήθηκε και μετά από τη σταθεροποίηση για την ηλικία, την βαρύτητα της αρχικής κάκωσης (με βάση την κλίμακα εισόδου Γλασκόβης, [GCS]) και τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας. Επίσης, οι ασθενείς με το ε4 αλλήλιο είχαν βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου (μικρότερη GCS) και μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε πολύ μεγαλύτερες σε αριθμό ασθενών μελέτες [226].

Ο πολυμορφισμός της apoE έχει επιπλέον μελετηθεί σε ασθενείς με μικρές επαναλαμβανόμενες κακώσεις, όπως αυτές που συμβαίνουν στους μποξέρ και βρέθηκε ότι οι ασθενείς με το ε4 αλλήλιο έχουν βαρύτερη κλινική εικόνα [227].

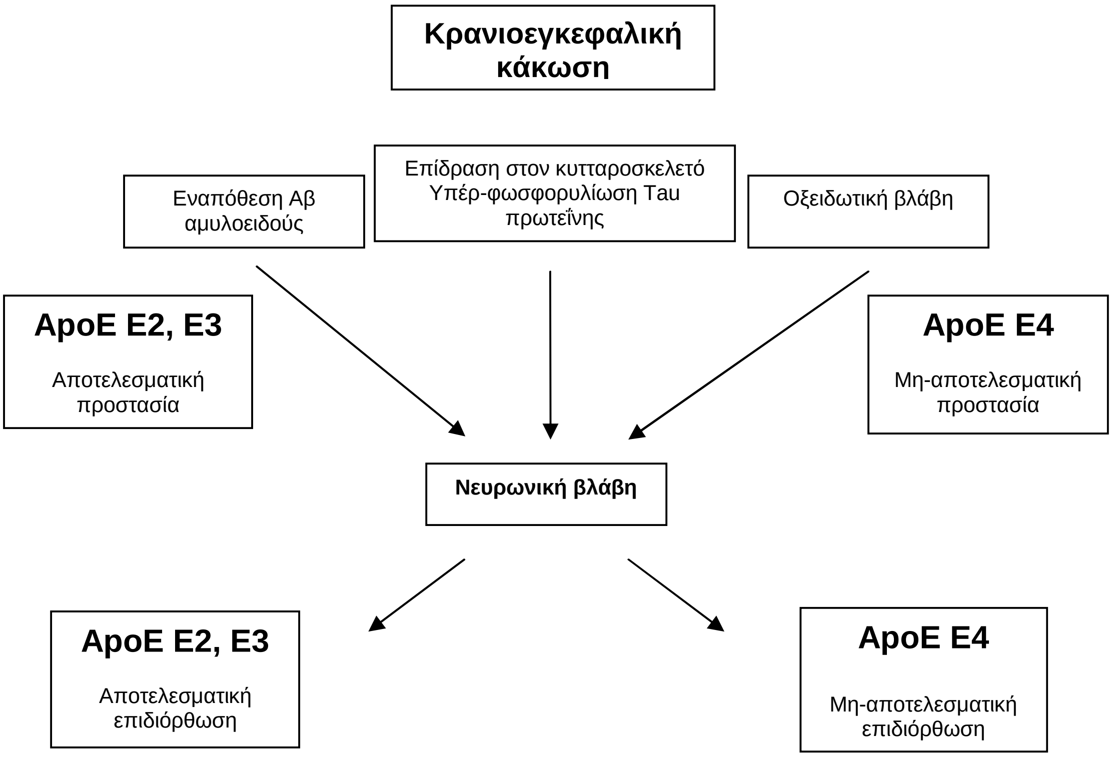
Επίσης, είναι πιθανό ο APOE γονότυπος να επηρεάζει και διάφορους άλλους ενδιάμεσους κλινικούς φαινότυπους των ασθενών με ΚΕΚ. Σε μια μελέτη [217] βρέθηκε ότι οι φορείς του ε4 αλληλίου είχαν πενταπλάσια πιθανότητα να παραμείνουν σε κωματώδη κατάσταση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (>7 ημέρες). Επίσης, ασθενείς με μετατραυματική απώλεια συνείδησης και μη-ευνοϊκή έκβαση είχαν υψηλότερη συχνότητα του ε4 αλληλίου σε σύγκριση με εκείνους που παρουσίαζαν ευνοϊκή έκβαση [228]. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι οι φορείς του ε4 αλληλίου είχαν την τάση να αναπτύσσουν μεγαλύτερα ενδοκράνια αιματώματα μετά από ΚΕΚ [229], και είχαν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης μετατραυματικής επιληψίας [230].

Πολλές μελέτες επίσης υποστηρίζουν ότι ο APOE γονότυπος πιθανό να επηρεάζει τη γνωστική λειτουργία και τη συμπεριφορά μετά από ΚΕΚ. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι οι φορείς του ε4 αλληλίου είχαν χαμηλότερη απόδοση σε διάφορες κλίμακες εκτίμησης νευροψυχολογικών παραμέτρων σε σύγκριση με τους μη-φορείς [231]. Παρόμοια, σε μια άλλη μελέτη [232] εκτιμήθηκε η γνωστική λειτουργία ασθενών πριν και μετά από ήπια ΚΕΚ και διαπιστώθηκε ότι οι φορείς του ε4 αλληλίου είχαν μειωμένη απόδοση σε σύγκριση με τους μη-φορείς. Επίσης, βρέθηκε ότι οι φορείς του ε4 αλληλίου παρουσίαζαν χαμηλότερη επίδοση σε διάφορες κλίμακες εκτίμησης της μνημονικής λειτουργίας [233] σε σχέση με τους μη-φορείς. Τέλος, σε μια μελέτη 77 ασθενών με ήπια ή σοβαρή ΚΕΚ διαπιστώθηκε ότι οι φορείς του ε4 αλληλίου παρουσίαζαν σε μεγαλύτερο ποσοστό διαταραχή της λειτουργίας του μετωπιαίου λοβού και διαταραχές συμπεριφοράς σε σύγκριση με τους μη-φορείς [234].

Αν και οι περισσότερες μελέτες φανερώνουν ότι ο APOE γονότυπος πιθανό να επιδρά στην έκβαση μετά από ΚΕΚ, ωστόσο κάποιες μελέτες δεν επιβεβαιώνουν τα παραπάνω αποτελέσματα [235]. Αυτό πιθανώς να οφείλονται στη διαφορετική συχνότητα των APOE αλληλίων μεταξύ των διάφορων πληθυσμών, την παρουσία άλλων γονιδίων-τροποποιητών, και/ή την αλληλεπίδραση γονιδιακών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Πιθανός μηχανισμός πολυμορφισμού της apoE στην εγκεφαλική κάκωση

1. Η apoE επηρεάζει το ρυθμό εναπόθεσης αμυλοειδούς στον εγκέφαλο. Ειδικότερα, η Ε4 ισομορφή σχετίζεται με αυξημένη εναπόθεση αμυλοειδούς [236] ενώ οι άλλες ισομορφές προστατεύουν τον εγκέφαλο. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι APOE ισομορφές διαφέρουν στην ικανότητα μεταφοράς του Αβ αμυλοειδούς διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [237]. Έτσι, ενώ οι Ε2 και Ε3 ισομορφές αναστέλλουν τη μεταφορά του Αβ, η Ε4 δεσμεύει το Αβ και διαπερνά με αυτόν τον τρόπο τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.



Εικόνα: Πιθανοί μηχανισμοί επίδρασης του APOE γονοτύπου στην έκβαση των ασθενών μετά από εγκεφαλική κάκωση.

2. Μελέτες δείχνουν ότι η apoE προστατεύει τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη και την υπεροξείδωση των λιπιδίων (lipid peroxidation), τα οποία εμπλέκονται στην εκφύλιση των νευρώνων. Αυτή η αντιοξειδωτική δράση έχει σχέση με τις διάφορες ισομορφές της apoE με την Ε4 να είναι λιγότερο αποτελεσματική σε σχέση με τις υπόλοιπες [238].

3. Η apoE βοηθά επίσης στην επιδιόρθωση και αντικατάσταση των κατεστραμμένων ιστών και στην ανάπτυξη νέων συνάψεων. Το ε4 αλλήλιο σχετίζεται με μικρότερη συναπτογένεση [239] και δυσλειτουργία του χολινεργικού συστήματος [240].

4. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η apoE έχει νευροτροφικές δράσεις και συμμετέχει στην ανάπτυξη των νευραξόνων μέσω επίδρασης στον κυτταροσκελετό. Η Ε3 ισομορφή σταθεροποιεί τον σχηματισμό μικροσωληναρίων μέσω σύνδεσής της με την tau πρωτεΐνη (μια πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση και τη διατήρηση της δομής τους) εμποδίζοντας έτσι την υπερ-φωσφορυλίωσή της και την εναπόθεσή της σε συσσωματώματα, ενώ η Ε4 ισομορφή αποσταθεροποιεί την σύνδεση των μικροσωληναρίων και αποτυγχάνει να συνδεθεί με την tau [241].

Υποκινητής του APOE γονίδιου

Στον υποκινητή του APOE γονιδίου έχουν περιγραφεί δύο λειτουργικοί πολυμορφισμοί που επηρεάζουν τη δραστηριότητά του. Συγκεκριμένα, υπάρχει ένας G/T πολυμορφισμός στη θέση -219 και ένας A/T πολυμορφισμός στη θέση -491 του. Έχει βρεθεί ότι η αντικατάσταση της θυμίνης σε γουανίνη στο νουκλεοτίδιο -219 προκαλεί αύξηση κατά 169% της δραστηριότητας του υποκινητή. Αντίθετα, η αντικατάσταση της αδενίνης σε θυμίνη στη θέση -491 καταλήγει σε μείωση κατά 63% της δραστηριότητάς του [242]. Η ποικιλομορφία αυτή στην περιοχή του υποκινητή, φαίνεται ότι επιδρά στην πιθανότητα εμφάνισης AD. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο TT γονότυπος του G-219T πολυμορφισμού και ο AA γονότυπος του A-491T πολυμορφισμού αυξάνουν τον κίνδυνο εκδήλωσης AD [243] και επηρεάζουν τα επίπεδα εναπόθεσης Αβ αμυλοειδούς στον εγκέφαλο ασθενών με AD [244, 245]. Σε μια μελέτη σε ασθενείς με ΚΕΚ [246] βρέθηκε ότι η γενετική ποικιλομορφία του υποκινητή επηρεάζει την εξάμηνη έκβαση των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι φορείς του TT γονοτύπου του G-219T πολυμορφισμού παρουσίαζαν χειρότερη έκβαση σε σύγκριση με τους GG και GT γονοτύπους. Στην ίδια μελέτη ο -491 A/T πολυμορφισμός δε βρέθηκε να επηρεάζει την έκβαση των ασθενών.

Neprilysin

Η συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου σε μερικούς ασθενείς μετά από ΚΕΚ πιθανό να είναι αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή και τη διάσπαση του Αβ αμυλοειδούς. Από την άλλη μεριά, μια από τις κύριες θεραπευτικές στρατηγικές της νόσου του Alzheimer είναι η ενεργοποίηση των πρωτεασών που εμπλέκονται στη διάσπαση του Αβ αμυλοειδούς. Ανάμεσα στις πρωτεάσες αυτές, κυρίαρχο ρόλο παίζει η neprilysin [247]. Μελέτες σε πρώιμα περιστατικά AD νόσου φανερώνουν ότι τα επίπεδα της neprilysin στον εγκεφαλικό φλοιό και το ΕΝΥ των ασθενών αυτών είναι μειωμένα [248, 249]. Επιπρόσθετα, σε knockout πειραματικά μοντέλα για το γονίδιο της neprilysin παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα Αβ αμυλοειδούς στον εγκεφαλικό ιστό [247]. Αντίθετα, η υπερέκφραση της neprilysin σχετίστηκε με μείωση στα επίπεδα του Αβ αμυλοειδούς και καθυστέρηση στην έναρξη σχηματισμού των αμυλοειδικών πλακών [250]. Ωστόσο, η neprilysin πιθανό να μην επιδρά στη διάσπαση των ήδη υπαρχόντων αμυλοειδικών πλακών, αλλά μόνο στην αναστολή σχηματισμού νέων αμυλοειδικών πλακών [251].

Ένας πολυμορφισμός GT επαναλήψεων στο γονίδιο της neprilysin έχει συσχετιστεί με την αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια του εγκεφάλου καθώς και με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης AD [252, 253]. Ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίζεται στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της neprilysin και είναι πιθανό να επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση του DNA, να επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου και με τον τρόπο αυτό το βαθμό διάσπασης του Αβ αμυλοειδούς. Πρόσφατα, ο πολυμορφισμός αυτός μελετήθηκε σε 81 ασθενείς που υπέστησαν ΚΕΚ, με μέσο όρο επιβίωσης 3.45 ημέρες. Η κλινική αυτή μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με περισσότερες GT επαναλήψεις είχαν αυξημένο κίνδυνο σχηματισμού Αβ πλακών [254]. Φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός στο γονίδιο της neprilysin πιθανό να προκαλεί αυξημένη προδιάθεση σχηματισμού αμυλοειδικών πλακών σε ασθενείς με ΚΕΚ.

COMT γονίδιο

Το COMT γονίδιο (catechol-o-methyltransferase), το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο που απενεργοποιεί τη δράση της ντοπαμίνης (DA) και της νορεπινεφρίνης (NE), εμφανίζει τρεις ισομορφές: (COMT Val/Val, COMT Val/Met, και COMT Met/Met). Οι τρεις αυτοί λειτουργικοί πολυμορφισμοί διαφέρουν στο ποσοστό επίδρασης στα επίπεδα της DA [255], επηρεάζοντας τις γνωστικές λειτουργίες που σχετίζονται με την DA [256, 257]. Σε μια μελέτη [258] βρέθηκε μια συσχέτιση ανάμεσα στον COMT Val158Met γονότυπο και τις ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες μετά από ΚΕΚ. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς που παρουσίαζαν υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου (Val/Val πολυμορφισμός), και προφανώς χαμηλότερα επίπεδα DA στο φλοιό, εμφάνιζαν χειρότερη επίδοση σε μια κλίμακα εκτίμησης των νοητικών εκτελεστικών λειτουργιών (Wisconsin Card Sorting Test, WCST), σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλή δραστηριότητα του ενζύμου (Met/Met) και προφανώς υψηλότερα επίπεδα DA στο φλοιό. Παρόμοια, σε μια άλλη μελέτη 39 ασθενών με ΚΕΚ και 27 υγιών ατόμων βρέθηκε μια συσχέτιση του Val αλληλίου με φτωχή απόδοση σε μια κλίμακα, η οποία εκτιμά τη λειτουργία του μετωπιαίου λοβού (Continuous Performance Test).

Dopamine D2 receptor γονίδιο

Το γονίδιο DRD2 (dopamine D2 receptor gene) είναι ένα άλλο γονίδιο στο οποίο διάφοροι λειτουργικοί πολυμορφισμοί τροποποιούν τη δράση της DA, και κατ' επέκταση τις γνωστικές λειτουργίες. Έχει βρεθεί ένας C/T πολυμορφισμός στη θέση Taq1 του DRD2 γονιδίου. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός καταλήγει σε τρεις ισομορφές (C/C, C/T, και T/T). Το T αλληλόμορφο (γνωστό και ως Taq1 A αλλήλιο) βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με ένα λειτουργικό αλλήλιο, το οποίο σχετίζεται με μείωση σε ποσοστό 40% της έκφρασης των D2 υποδοχέων στον κερκοφόρο πυρήνα του εγκεφάλου [259]. Επίσης, το T αλληλόμορφο πιθανό να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της AD [260]. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την επιβεβαίωση αυτής της συσχέτισης.

Σε μια μελέτη [261] εκτιμήθηκε η λειτουργία της μνήμης και της προσοχής σε 39 ασθενείς με ήπια ΚΕΚ και 27 υγιή άτομα σε συνδυασμό με την παρουσία του T αλληλίου. Οι φορείς του T αλληλίου και των δύο ομάδων παρουσίαζαν χειρότερη απόδοση στην κλίμακα λεκτικής ευχέρειας CVLT (California Verbal Learning Test) σε σύγκριση με τους μη-φορείς. Επίσης, δεν υπήρχαν διαφορές στην CPT κλίμακα (Continuous Performance Test, η οποία εκτιμά τη λειτουργία του μετωπιαίου λοβού) ανάμεσα στους φορείς ή μη- του T αλληλίου των δύο ομάδων. Ωστόσο, οι φορείς του T αλληλίου με ΚΕΚ παρουσίαζαν καθυστέρηση στο χρόνο απάντησης, μειωμένη εγρήγορση και απόσπαση της προσοχής σε σύγκριση με τους υγιείς φορείς του T αλληλίου. Επίσης, δεν σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους υγιείς φορείς του T αλληλίου, τους μη-φορείς του T αλληλίου με ΚΕΚ και τους υγιείς, μη-φορείς του T αλληλίου. Παρόλο που τα ευρήματα αυτά φανερώνουν μια αλληλεπίδραση ανάμεσα στους ασθενείς με ΚΕΚ και την παρουσία του T αλληλίου, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διαλευκανθεί η επίδραση του T αλληλίου στις γνωστικές λειτουργίες μετά από ΚΕΚ.

Γονίδια ιντερλευκινών

Στο σημείο της βλάβης του εγκεφαλικού παρεγχύματος μετά από ΚΕΚ, ενεργοποιούνται διάφορες φλεγμονώδεις αντιδράσεις, στις οποίες συμμετέχει και η οικογένεια της ιντερλευκίνης-1 (IL-1). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τρία πεπτίδια:

IL-1α, IL-1β, και IL-1 Receptor Antagonist (IL-1RA). Η IL-1α και η IL-1β είναι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και κωδικοποιούνται από τα IL-1A και IL-1B γονίδια, αντίστοιχα, τα οποία έχουν χαρτογραφηθεί στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 2 [262]. Η IL-1RA αναστέλλει τη δράση της IL-1α και της IL-1β, και κωδικοποιείται από το IL1RN γονίδιο [263]. Υπάρχει ένας λειτουργικός πολυμορφισμός στην 5΄ ρυθμιστική περιοχή του IL-1A γονιδίου, στη θέση -889 [262]. Το αλληλόμορφο IL-1A*2 έχει συσχετισθεί μεταξύ άλλων με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης AD [172, 173, 264, 265]. Το IL-1B γονίδιο είναι επίσης πολυμορφικό. Ένας λειτουργικός πολυμορφισμός εντοπίζεται στο 5^{ο} εξόνιο του IL-1B γονιδίου, στη θέση +3953. Έχει βρεθεί ότι η ύπαρξη ομοζυγωτίας για το αλλήλιο 2 σχετίζεται με μια τετραπλάσια αύξηση στην έκφραση της IL-1β σε σύγκριση με την ομοζυγωτία για το αλλήλιο 1 [266]. Ένας άλλος πολυμορφισμός του IL-1B γονιδίου εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή, στη θέση -511 [267]. Τέλος, στο γονίδιο της IL1RN υπάρχει ένας λειτουργικός πολυμορφισμός στο 2^{ο} ιντρόνιο και περιέχει εν σειρά επαναλήψεις ποικίλου αριθμού (variable number of tandem repeats). Ο πολυμορφισμός αυτός καταλήγει σε 5 αλλήλια, με το IL-1RN αλλήλιο 2 να σχετίζεται με αυξημένη έκκριση IL-1β in vivo. Επίσης, έχουν δημοσιευθεί συσχετίσεις ανάμεσα στους IL-1B +3953, IL-1B-511 και IL-1RA πολυμορφισμούς και τον κίνδυνο εμφάνισης AD [173, 268].

Ο ρόλος των παραπάνω πολυμορφισμών έχει διερευνηθεί και σε ασθενείς με ΚΕΚ. Σε μια μελέτη [269] παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό του IL-1B γονιδίου και την έκβαση μετά από ΚΕΚ. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι 14 από τους 25 (ποσοστό 56%) φορείς του IL-1B(+3953)*2 είχαν μη-ευνοϊκή έκβαση σε σύγκριση με 8 από τους 44 (ποσοστό 18.1%) μη-φορείς του αλληλίου 2. Επίσης, 20 από τους 28 (ποσοστό 71.4%) φορείς του IL-1B(-511)*2 είχαν μη-ευνοϊκή έκβαση σε σύγκριση με ποσοστό 2% (2 από τους 41) μη-φορέων του αλληλίου 2 (P=0.005). Αντίθετα, δε βρέθηκε συσχέτιση του IL-1A (-889) πολυμορφισμού με την έκβαση μετά από ΚΕΚ [270].

Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) είναι μια άλλη κυτοκίνη που εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ και συγκεκριμένα στην προστασία των νευρωνικών πληθυσμών. Έχει βρεθεί ότι αυξημένα επίπεδα IL-6 στο εγκεφαλικό παρέγχυμα σχετιζόταν με ευνοϊκή έκβαση μετά από ΚΕΚ [271, 272]. Ωστόσο, ένας πολυμορφισμός στον υποκινητή του γονιδίου της IL-6 (-174) δε βρέθηκε να σχετίζεται με την έκβαση μετά από ΚΕΚ, πιθανόν λόγω της ετερογένειας του πληθυσμού [272].

p53 γονίδιο

Έχει βρεθεί ότι ο μηχανισμός της απόπτωσης ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια των παθοφυσιολογικών γεγονότων που ακολουθούν την ΚΕΚ [37]. Το p53 γονίδιο είναι ένας ρυθμιστής της απόπτωσης [273] και εμφανίζει έναν πολυμορφισμό που καταλήγει στην ύπαρξη προλίνης (pro) ή αργινίνης (arg) στο αμινοξύ 72 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης [274]. Ο λειτουργικός αυτός πολυμορφισμός επάγει την απόπτωση, ενώ ο Arg/Arg γονότυπος είναι ο πιο αποτελεσματικός παράγοντας ενεργοποίησής της [275]. Σε μια μελέτη [276] ερευνήθηκε συσχέτιση του Arg72Pro πολυμορφισμού με την έκβαση μετά από σοβαρή ΚΕΚ. Βρέθηκε ότι ανάμεσα στους ασθενείς με μη-ευνοϊκή έκβαση, η συχνότητα του Arg/Arg γονοτύπου ήταν υψηλότερη (69%) σε σύγκριση με την αντίστοιχη των Arg/Pro και Pro/Pro γονοτύπων (31%). Επίσης, ο Arg/Arg γονότυπος συσχετίστηκε με μεγαλύτερο κίνδυνο (2.9 φορές) για μη-ευνοϊκή έκβαση κατά την έξοδο από τη μονάδα εντατικής θεραπείας. Επομένως, ο πολυμορφισμός του p53 γονιδίου πιθανό να επηρεάζει την έκβαση μετά από ΚΕΚ.

Angiotensin converting enzyme (ACE)

Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) αποτελεί κύριο συστατικό του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, το οποίο ρυθμίζει την ομοιόσταση των αγγείων. Το ACE ένζυμο μετατρέπει την αγγειοτενσίνη Ι σε αγγειοτενσίνη ΙΙ, που αποτελεί συσταλτικό παράγοντα των αγγείων [277]. Το γονίδιο του ACE ενζύμου έχει χαρτογραφηθεί στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 στην περιοχή 17q23. Έχει βρεθεί ένας πολυμορφισμός ένθεσης/έλλειψης (I/D: insertion/deletion) στο ιντρόνιο 16 του ACE γονιδίου που καταλήγει σε τρεις γονοτύπους (II, ID και DD), οι οποίοι επηρεάζουν τα επίπεδα του ACE ενζύμου [278]. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του ACE ενζύμου στο πλάσμα ήταν υψηλότερα στα άτομα με DD γονότυπο [279]. Επίσης, το I αλλήλιο πιθανό να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης AD [280, 281], ενώ το D αλλήλιο έχει συσχετιστεί με μείωση της γνωστικής λειτουργίας στον γενικό πληθυσμό [282-284] και άνοια σε ηλικιωμένα άτομα ηλικίας 74 ετών και άνω [285].

Σε μια μελέτη [286] εκτιμήθηκε η επίδραση του ACE I/D πολυμορφισμού στη γνωστική λειτουργία μετά από ήπια και σοβαρή ΚΕΚ. Παρατηρήθηκε ότι οι φορείς του D αλληλίου είχαν χειρότερη απόδοση σε κλίμακες εκτίμησης της προσοχής και της ταχύτητας επεξεργασίας των διάφορων δεδομένων (Grooved Pegboard και Trial Making Tests) σε σύγκριση με τους φορείς του I αλληλίου. Ο ακριβής μηχανισμός επίδρασης του ACE πολυμορφισμού στην έκβαση μετά από ΚΕΚ παραμένει άγνωστος. Ωστόσο, υποστηρίζεται ότι η διαταραχή της ροής του αίματος στον εγκέφαλο και/ή η αυτορύθμιση της πίεσης του αίματος πιθανό να επηρεάζουν την σύσπαση των εγκεφαλικών αγγείων και την εγκεφαλική βλάβη μετά από ισχαιμία. Επίσης, η επίδραση του ACE πολυμορφισμού στην έκβαση μετά από ΚΕΚ, πιθανό να οφείλεται στην ικανότητα του ενζύμου να αναστέλλει τη συσσώρευση Aβ αμυλοειδούς και την επακόλουθη κυτταροτοξικότητα [287].

CACNA1A γονίδιο

Μελέτες έχουν συνδέσει παρερμηνεύσιμες (missense) μεταλλάξεις στο CACNA1A γονίδιο, και κυρίως στην περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί τα κανάλια Ca^{2+} (CACNA1A calcium channel subunit gene), με την όψιμη εμφάνιση εγκεφαλικού οιδήματος και θανατηφόρου κώματος μετά από ήπια ΚΕΚ [288]. Πιο συγκεκριμένα, σε 3 ασθενείς που ανέπτυξαν όψιμο εγκεφαλικό οίδημα και κώμα μετά από ήπια ΚΕΚ, βρέθηκε μια μετάλλαξη στο CACNA1A γονίδιο στην οποία υπήρχε αντικατάσταση της σερίνης (S) σε λυσίνη (L) στο κωδικόνιο 218 (S218L). Ωστόσο, περαιτέρω κλινικές μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν τη συσχέτιση της παραπάνω μετάλλαξης του CACNA1A γονιδίου με την έκβαση μετά από ΚΕΚ.

Πίνακας: Μελέτες συσχέτισης γενετικών πολυμορφισμών σε ασθενείς με ΚΕΚ

Αναφορά	Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Μεθοδολογία	Φαινότυπος	Αποτελέσματα	Σχόλια
Nicoll et al (1995)[225]	APOE	ε2/ε3/ε4	Παθολογοανατομικό υλικό από 90 περιπτώσεις ασθενών με ΚΕΚ (23 Αβ+)	Εναπόθεση Αβ αμυλοειδούς	θετικό	APOE4 αλλήλιο, p<0.00001
Sorbi et al (1995)[228]	APOE	ε2/ε3/ε4	16 νεαρής ηλικίας ασθενείς με ΚΕΚ	Μετατραυματική αμνησία	θετικό	APOE4 αλλήλιο, p<0.01
Mayeux et al (1995)[174]	APOE	ε2/ε3/ε4	236 ηλικιωμένα άτομα με ιστορικό ΚΕΚ	Κίνδυνος εμφάνισης AD	θετικό	Δεκαπλάσιος κίνδυνος εμφάνισης AD μετά από ΚΕΚ παρουσία APOE4 αλληλίου
Katzman et al (1996)[289]	APOE	ε2/ε3/ε4	160 ασθενείς με AD, 69 φυσιολ. μάρτυρες με ιστορικό ΚΕΚ	Κίνδυνος εμφάνισης AD	θετικό	APOE4 αλλήλιο και ΚΕΚ αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης AD, OR 13.5, 95% CI 2.63-69.12, p=0.0018
Teasdale et al (1997)[218]	APOE	ε2/ε3/ε4	89 ασθενείς με ΚΕΚ	Μη-ευνοϊκή εξάμηνη έκβαση	θετικό	APOE4 αλλήλιο, OR 0.23, 95% CI 0.06-0.82, p=0.024
Jordan et al (1997)[227]	APOE	ε2/ε3/ε4	30 μποξέρ	Νευρολογική επιβάρυνση (CBI κλίμακα)	θετικό	Μποξέρ με το APOE4 αλλήλιο είχαν σοβαρότερη νευρολογική επιβάρυνση p<0.01
Friedman et al (1999)[217]	APOE	ε2/ε3/ε4	69 ασθενείς με ΚΕΚ	Δυσμενής κλινική έκβαση	θετικό	APOE4 αλλήλιο
Mehta et al (1999)[290]	APOE	ε2/ε3/ε4	797 άτομα με ιστορικό ΚΕΚ	Κίνδυνος εμφάνισης άνοιας και AD μετά από παρακολούθηση κατά μέσο όρο για 2.1 χρόνια	αρνητικό	-
Plassman et al (2000)[291]	APOE	ε2/ε3/ε4	46 ασθενείς με AD, 356 στρατιωτικοί χωρίς AD, αλλά με ιστορικό ΚΕΚ	Κίνδυνος εμφάνισης AD	αρνητικό	-
Lichtman et al (2000)[292]	APOE	ε2/ε3/ε4	31 ασθενείς με ΚΕΚ και αξονότμηση	Κλίμακες λειτουργικής αυτονομίας μετά από 6 μήνες	θετικό	Οι φορείς του APOE4 αλληλίου είχαν χαμηλότερες τιμές στις συγκεκριμένες κλίμακες, p=0.05
Guo et al (2000)[293]	APOE	ε2/ε3/ε4	942 ασθενείς με AD και ΚΕΚ, 327 φυσιολογικοί μάρτυρες	Κίνδυνος εμφάνισης AD	θετικό	Η ΚΕΚ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης AD απουσία APOE4 αλληλίου, OR 3.3, 95%CI 2.0-5.5
Kutner et al (2000)[294]	APOE	ε2/ε3/ε4	53 εν ενεργεία ποδοσφαιριστές	Αξιολόγηση νευροψυχολογικών παραμέτρων	θετικό	Οι ποδοσφαιριστές μεγαλύτερης ηλικίας που είχαν το APOE4 αλλήλιο έλαβαν χαμηλότερες τιμές στις κλίμακες ελέγχου των γνωστικών λειτουργιών, p=0.004
Liaquat et al (2002)[229]	APOE	ε2/ε3/ε4	129 ασθενείς με ΚΕΚ	Όγκος αιματώματος Δυσμενής GOS μετά από 6 μήνες	θετικό θετικό	Το Ε4 αλλήλιο συσχετίστηκε με αιματώματα μεγαλύτερου όγκου, p=0.0056 APOE4 αλλήλιο, p=0.015
Crawford et al (2002)[233]	APOE	ε2/ε3/ε4	110 ασθενείς με ΚΕΚ	Κλίμακες ελέγχου της μνήμης 6 μήνες μετά το τραύμα	θετικό	Οι φορείς του APOE4 αλληλίου είχαν χαμηλότερες επιδόσεις στις κλίμακες ελέγχου της μνήμης
Liberman et al (2002)[231]	APOE	ε2/ε3/ε4	87 ασθενείς με ήπια ή μέτρια ΚΕΚ	Νευροψυχολογική αξιολόγηση στις 3 και 6 εβδομάδες	θετικό	Οι φορείς του APOE4 αλληλίου είχαν χαμηλότερες τιμές στις συγκεκριμένες μετρήσεις κατά την πρώτη επίσκεψη
Chiang et al (2003)[226]	APOE	ε2/ε3/ε4	100 ασθενείς με ΚΕΚ	Δυσμενής GOS μετά από 6 μήνες	θετικό	APOE4 αλλήλιο, OR 3.01, 95%CI 1.02-8.88, p=0.04
Nathoo et al (2003)[235]	APOE	ε2/ε3/ε4	110 μαύροι, ασθενείς με ΚΕΚ	Δυσμενής GOS μετά από 6 μήνες	αρνητικό	-

Diaz-Arrastia et al (2003)[230]	APOE	ε2/ε3/ε4	106 ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή ΚΕΚ	Μετατραυματική επιληψία GOS μετά από 6 μήνες	θετικό αρνητικό	Αυξημένος κίνδυνος παρουσία Ε4 αλληλίου, OR 2.41,95%CI 1.15-5.07, p=0.03 -
Millar et al (2003)[295]	APOE	ε2/ε3/ε4	396 ασθενείς με ΚΕΚ	GOS μετά από 6 μήνες, Νευροψυχολογική έκβαση κατά μέσο όρο μετά από 18 χρόνια	αρνητικό	-
Kerr et al (2003)[296]	APOE	ε2/ε3/ε4	91 ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ	Συγκεντρώσεις αμινοξέων-νευροδιαβιβαστών (ασπαρτικό οξύ, γλουταμικό οξύ) και ενεργειακών μεταβολιτών (αναλογία γαλακτικού οξέος/πυροσταφυλικό οξύ)	θετικό	Οι ασθενείς με το APOE4 αλλήλιο είχαν σταθερά αυξημένα επίπεδα ασπαρτικού οξέος και αναλογίας γαλακτικού/πυροσταφυλικό μετά από ΚΕΚ
Chamelian et al (2004)[297]	APOE	ε2/ε3/ε4	90 ασθενείς με ήπια έως μέτρια ΚΕΚ	GOS, Νευροψυχολογική έκβαση	αρνητικό	-
Sundstrom et al (2004)[232]	APOE	ε2/ε3/ε4	34 ασθενείς με ήπια ΚΕΚ πριν και μετά το τραύμα	Νευροψυχολογική εκτίμηση	θετικό	Το APOE4 αλλήλιο συσχετίστηκε με μειωμένη μετατραυματική επίδοση
Quinn et al (2004)[199]	APOE	ε2/ε3/ε4	Παθολογοανατομικό υλικό από 106 περιστατικά ηλικίας 2-19 χρόνων	Εγκεφαλικό οίδημα	αρνητικό	-
Koponen et al (2004)[298]	APOE	ε2/ε3/ε4	60 ασθενείς με ΚΕΚ	Άνοια Ψυχιατρικές ανωμαλίες μετά από περίπου 30 χρόνια	θετικό αρνητικό	Το APOE4 αλλήλιο αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης άνοιας, p=0.028 -
Teasdale et al (2005)[299]	APOE	ε2/ε3/ε4	1094 ασθενείς με ΚΕΚ	GOS στους 6 μήνες	αρνητικό	Το Ε4 αλλήλιο σχετίστηκε με μη-ευνοϊκή έκβαση μόνο σε ηλικίες <15 ετών, OR 3.06, 95%CI 1.22-7.65, p=0.07
Leclercq et al (2005)[300]	APOE	ε2/ε3/ε4	Παθολογοανατομική εξέταση σε 88 περιπτώσεις με ΚΕΚ	Εγκεφαλική αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια	θετικό	Το Ε4 αλλήλιο σχετίστηκε με εγκεφαλική αμυλοειδωσική αγγειοπάθεια, p=0.021
Ariza et al (2006)[234]	APOE	ε2/ε3/ε4	77 ασθενείς με ΚΕΚ	Νευροψυχολογικές επιδόσεις τουλάχιστον 6 μήνες μετά την ΚΕΚ	θετικό	Το APOE4 αλλήλιο αυξάνει τον κίνδυνο κακής επίδοσης
Smith et al (2006)[301]	APOE	ε2/ε3/ε4	239 θανατηφόρες περιπτώσεις ΚΕΚ	Μέτριες/σοβαρές εγκεφαλικές θλάσεις Σοβαρή ισχαιμική βλάβη	θετικό αρνητικό	Το APOE4 αυξάνει τον κίνδυνο των εγκεφαλικών θλάσεων, p=0.05 p=0.08
Jiang et al (2006)[302]	APOE	ε2/ε3/ε4	110 ασθενείς με ΚΕΚ	Επιδείνωση της κλινικής εικόνας στην οξεία φάση (<7 ημέρες μετά την ΚΕΚ)	θετικό	Το APOE4 αλλήλιο αυξάνει τον κίνδυνο επιδείνωσης της κλινικής εικόνας, OR 4.84, 95%CI 1.44-16.21, p=0.011
Isoniemi et al (2006)[303]	APOE	ε2/ε3/ε4	58 ασθενείς με ΚΕΚ	Μέγεθος ιππόκαμπου, ατροφία εγκεφάλου κατά μέσο όρο 31.3 χρόνια μετά την ΚΕΚ	αρνητικό	-
Kerr et al (2006)[296]	APOE	ε2/ε3/ε4	54 ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ	Εγκεφαλική αιματική ροή ανιχνευόμενη με Xe-CT εντός 24h μετά την ΚΕΚ	θετικό	Το APOE4 αλλήλιο σχετίστηκε με αυξημένη εγκεφαλική αιματική ροή
Ponsford et al (2007)[304]	APOE	ε2/ε3/ε4	120 ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ΚΕΚ	Έλεγχος γνωστικών λειτουργιών στους 3, 6, 12 μήνες	αρνητικό	-
Han et al (2007)[305]	APOE	ε2/ε3/ε4	78 ασθενείς με ήπια έως μέτρια ΚΕΚ	Νευροψυχολογικός έλεγχος στον 1 μήνα	θετικό	Οι φορείς του APOE4 αλληλίου σχετίστηκαν με καλύτερες επιδόσεις σε κάποιους ελέγχους
Alexander et al (2007)[9]	APOE	ε2/ε3/ε4	123 ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ	GOS στους 3, 6, 12 και 24 μετά την ΚΕΚ	θετικό	Οι φορείς του APOE4 αλληλίου είχαν πιο βραδύ ρυθμό ανάρρωσης

Hiekkanen et al (2007)[306]	APOE	ε2/ε3/ε4	33 ασθενείς με μη-ήπια ΚΕΚ	Εγκεφαλικές κακώσεις καθοριζόμενες με βάση τα ευρήματα της MRI περίπου 1 εβδομάδα και 1 χρόνο μετά την ΚΕΚ	αρνητικό	-
Zhou et al (2008)[307]	APOE	ε2/ε3/ε4	Μετα-ανάλυση: 14 μελέτες με συνολικά 2427 συμμετέχοντες	GCS εισόδου Δυσμενής GOS στους 6 μήνες	αρνητικό θετικό	- APOE4 αλλήλιο, RR 1.36, 95%CI 1.04-1.78
Willemse-van Son et al (2008)[308]	APOE	ε2/ε3/ε4	79 ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή ΚΕΚ	GOS στους 3, 6, 12, 18, 24, 36 μήνες μετά την ΚΕΚ	θετικό	Οι φορείς του APOE4 αλληλίου είχαν καλύτερη έκβαση, OR 0.26, 95% CI 0.02-0.51, p=0.037
Tanriverdi et al (2008)[309]	APOE	ε2/ε3/ε4	93 ασθενείς με ΚΕΚ, 27 φυσιολογικοί μάρτυρες	Κίνδυνος δυσλειτουργίας της υπόφυσης μετά την ΚΕΚ	θετικό	Χαμηλότερος κίνδυνος δυσλειτουργίας της υπόφυσης στους APOE3/E3 ομοζυγώτες, OR 0.29, 95% CI 0.11-0.78, p=0.01
Brichtova et al (2008)[310]	APOE	ε2/ε3/ε4	70 παιδιά με ΚΕΚ	GCS κατά την εισαγωγή, GOS σε 1 έτος	θετικό	Τα παιδιά με APOE4 γονότυπο είχαν μη-ευνοϊκή νευρολογική έκβαση μετά από ΚΕΚ
Luukinen et al (2008)[311]	APOE	ε2/ε3/ε4	134 άτομα ηλικίας >70 ετών, 28 με τραύμα κεφαλής, χωρίς σαφή ΚΕΚ	Κίνδυνος άνοιας μετά από 9 χρόνια παρακολούθησης	θετικό	Αυξημένος κίνδυνος άνοιας στους φορείς του ApoE4 αλληλίου, OR 2.70, 95% CI 1.02-7.16
Ost et al (2008)[312]	APOE	ε2/ε3/ε4	96 ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ	Θνησιμότητα σε 1 έτος μετά την ΚΕΚ	θετικό	Οι άντρες-φορείς του APOE4 αλληλίου είχαν αυξημένη θνησιμότητα σε σχέση με τις γυναίκες (p=0.0079)
Rapoport et al (2008)[313]	APOE	ε2/ε3/ε4	49 ασθενείς με ήπια ΚΕΚ, 68 φυσιολογικοί μάρτυρες	Νευροψυχολογική επίδοση στο $1^{ο}$ και $2^{ο}$ έτος μετά την ΚΕΚ	αρνητικό	-
Kristman et al (2008)[314]	APOE	ε2/ε3/ε4	318 αθλητές νεαρής ηλικίας (28 με διάσειση)	Κίνδυνος διάσεισης	αρνητικό	-
Ashman et al (2008)[87]	APOE	ε2/ε3/ε4	54 ενήλικες με ΚΕΚ, 40 φυσιολογικοί μάρτυρες	Νευροψυχολογικές μετρήσεις, επανεξέταση 2-5 χρόνια αργότερα	αρνητικό	-
Han et al (2009)[315]	APOE	ε2/ε3/ε4	46 στρατιωτικοί με ήπια έως μέτρια ΚΕΚ	Αλλαγή εργασίας μετά την ΚΕΚ	θετικό	Το APOE4 αλλήλιο πιθανό να σχετίζεται με την αλλαγή εργασίας μετά την ΚΕΚ
Muller et al (2009)[264]	APOE	ε2/ε3/ε4	59 ασθενείς με ήπια ΚΕΚ	Νευροψυχολογική εκτίμηση κατά την εισαγωγή και 6 μήνες μετά την ΚΕΚ	θετικό	Ο ApoE4 γονότυπος σχετίστηκε με χαμηλή επίδοση στις νοητικές λειτουργίες, p=0.046
Hiekkanen et al (2009)[316]	APOE	ε2/ε3/ε4	33 ασθενείς με ΚΕΚ	Κλίμακα συμπτωμάτων κάκωσης, GOS σε 1 έτος μετά την ΚΕΚ	αρνητικό	-
Lo et al (2009)[317]	APOE	ε2/ε3/ε4	65 παιδιά σε κρίσιμη κατάσταση	Εγκεφαλική πίεση αιμάτωσης (CPP)	θετικό	Σημαντικά χαμηλότερη CPP στους ApoE4 φορείς με μη-ευνοϊκή έκβαση, p=0.03
Lendon et al (2003)[246]	APOE υποκινητής	-219G/T -491A/T -427C/T	92 ασθενείς με ΚΕΚ	GOS σε 6 μήνες	αρνητικό αρνητικό αρνητικό	Στατιστικά μη-σημαντικό όταν ελέγχεται με λογιστική παλινδρόμηση - -
Jiang et al (2007)[318]	APOE υποκινητής	-219G/T -491A/T -427C/T	110 ασθενείς με ΚΕΚ	Επιδείνωση της κλινικής εικόνας στην οξεία φάση (<7 ημέρες μετά την ΚΕΚ)	αρνητικό αρνητικό αρνητικό	- Ο -491AA γονότυπος δρα συνεργικά με το APOE4 αλλήλιο -
Jiang et al (2008)[319]	APOE υποκινητής	-219G/T -491A/T -427C/T	110 ασθενείς με ΚΕΚ	Επιδείνωση της CT στην οξεία φάση (<7 ημέρες μετά την ΚΕΚ)	αρνητικό αρνητικό αρνητικό	- - -
Terrell et al (2008)[320]	APOE	ε2/ε3/ε4	195 ενεργοί ποδοσφαιριστές και	Κίνδυνος εγκεφαλικής διάσεισης	αρνητικό	-

	Tau APOE υποκινητής	His47Tyr Ser53Pro -219G/T	72 άτομα με ιστορικό εγκεφαλικής διάσεισης τα προηγούμενα 8 χρόνια		αρνητικό αρνητικό θετικό	- - Ο TT γονότυπος αυξάνει τον κίνδυνο εγκεφαλικής διάσεισης, OR 2.7, 95% CI 1.1-6.8, p=0.03
Johnson et al. (2009)[254]	Neprilysin	GT επαναλήψεις στο υποκινητή	Παθολογοανατομική μελέτη σε 81 περιστατικά με ΚΕΚ	Σχηματισμός Αβ πλακών	θετικό	Αυξημένος κίνδυνος εάν ο συνολικός αριθμός GT επαναλήψεων >41, OR 10.1, 95% CI 3.1-32.5, p=0.0001
Martinez et al (2005)[276]	p53	Arg72Pro	90 ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ	Δυσμενής GOS κατά την έξοδο από το νοσοκομείο GOS σε 6 μήνες	θετικό αρνητικό	Arg/Arg, OR 2.9, 95% CI 1.05-8.31, p=0.039 -
Ariza et al (2006)[286]	ACE	I/D	73 ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή ΚΕΚ	Νευροψυχολογική εκτίμηση μετά την άρση της μετατραυματικής αμνησίας	θετικό	Οι φορείς του D αλληλίου είχαν καλύτερη επίδοση στους συγκεκριμένους ελέγχους
Uzan et al. (2005)[321]	IL-1b	+3953 C/T -511 A/G	69 ασθενείς με ΚΕΚ	Δυσμενής GOS στους 6 μήνες Δυσμενής GOS στους 6 μήνες	θετικό θετικό	Allele 2, OR 0.25, 95% CI 0.12-0.55, p= 0.0004 Allele 2, p=0.005
Hadjigeorgiou (2005)[322]	IL-1RA IL-1b	VNTR -511 A/G	151 ασθενείς με ΚΕΚ	Εγκεφαλική αιμορραγία	θετικό αρνητικό	Allele 2, OR 4.57, 95% CI 1.67-12.96, p = 0.004 -
Tanriverdi et al (2006)[270]	IL-1a	-889 C/T	71 ασθενείς με ΚΕΚ	GOS σε 6 μήνες	αρνητικό	-
Dardiotis et al. (2006)[323]	IL-1a	-889 C/T	215 ασθενείς με ΚΕΚ	GOS σε 6 μήνες	αρνητικό	-
Minambres et al (2003)[272]	IL-6	-174 C/G	62 ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ	GOS σε 6 μήνες	αρνητικό	-
McAllister et al (2005)[261]	ANKK1	rs1800497	39 ασθενείς με ήπια ΚΕΚ, 27 φυσιολογικοί μάρτυρες	Νευροψυχολογική εκτίμηση 38.4 ημέρες (SD=24.4) μετά την ΚΕΚ	θετικό	Το αλλήλιο T σχετίστηκε με πιο μεγαλύτερη λανθάνουσα περίοδο απάντησης μετά την ΚΕΚ
McAllister et al (2008)[261]	ANKK1 NCAM DRD2	31 polymorphisms	93 ασθενείς με ΚΕΚ και 21 μάρτυρες	Νευροψυχολογική εκτίμηση 43.1 ημέρες (SD=15.8) μετά την ΚΕΚ	θετικό	Το T αλλήλιο (rs1800497) και ένα απλότυπος τριών SNPs εντός του ANKK1 γονιδίου σχετίστηκαν με καλή έκβαση των νοητικών λειτουργιών
Lipsky et al (2005)[258]	COMT	Val158Met	113 ασθενείς με ΚΕΚ	Νευροψυχολογική εκτίμηση	θετικό	Οι Val ομοζυγώτες είχαν χειρότερες επιδόσεις
Chan et al (2008)[324]	SLC6A4	5-HTTLPR rs25531	174 ασθενείς με ΚΕΚ	Κατάθλιψη	αρνητικό	-

ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-1 (IL-1)

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, ενώ 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 μοριακό βάρος (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 πεπτίδιο σήματος και εκκρίνεται από τα κύτταρα αμέσως μετά την παραγωγή της.

Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων της IL-1 (IL-1R): ο υποδοχέας τύπου Ι (IL-1RI) που παράγει ενδοκυττάριο σήμα, και ο υποδοχέας τύπου ΙΙ (IL-1RII) που αλληλεπιδρά με την IL-1 χωρίς όμως τη μεταγωγή ενδοκυττάριου σήματος. Με την πρόσδεση της IL-1 στον υποδοχέα τύπου Ι σχηματίζεται ένα σύμπλοκο, το οποίο συνδέεται με την AcP (IL-1R-accessory protein) [325]. Ο ετεροδιμερισμός των κυτταροπλασματικών περιοχών του IL-1RI υποδοχέα και του συμπλόκου IL-1R-AcP συμβάλλουν στη μεταγωγή ενδοκυττάριου σήματος. Οι εξωκυττάριες 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 4.200 ζευγών βάσεων (bp) που βρίσκεται ανοδικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής και μιας περιοχής 200bp που κωδικοποιεί για τον υποκινητή του γονιδίου [326].

Παραγωγή της IL-1α

Η βιολογικά ενεργή μορφή της IL-1α είναι ένα καρβοξυτελικό πεπτίδιο με 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 [327]. 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 εξωκυττάριες πρωτεάσες [177]. Επίσης, η proIL-1α διασπάται από πρωτεάσες κυστεΐνης που καλούνται καλπαΐνες (calcium-dependent, membrane-associated cysteine proteases-calpains) [177, 328]. Η παρουσία αυξημένων ιόντων Ca^{2+} επάγει την ενεργοποίηση της καλπαΐνης, 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 [329].

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 καλπαϊνών [329].

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 [330] και μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια [331]. Η σύνδεση με μεθύλια (myristoylation) 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 [332]. 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 [333, 334]. Και τα δύο μόρια συντίθενται στο κυτταρόλυμα (τα μη κοκκώδη συστατικά του κυτταροπλάσματος) με τη βοήθεια κυτταροσκελετικών δομών (μικροσωληνίσκοι) και όχι του ενδοπλασματικού δικτύου [327, 335]. Τα ανενεργά πρόδρομα μόρια των δύο αγωνιστών συνδέονται με μεθύλια σε ειδικά κατάλοιπα λυσίνης [330]. Ωστόσο, οι δύο κυτοκίνες διαφέρουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, τη σταθερότητα του mRNA, τη μετάφραση, την περαιτέρω επεξεργασία και 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 ενδοκυττάριων 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 [336, 337]. Η παρουσία IL-1 στο εσωτερικό του κυττάρου διατηρεί υψηλά τα επίπεδα του mRNA της IL-1β για 24 ώρες [239, 338].

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 [330]. 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 [339]. Μικρές συγκεντρώσεις IL-1β έχουν βρεθεί στα λυσοσώματα [340] και στους μικροσωληνίσκους [327], 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 [15].

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 [15] 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-1R (IL-1 Receptor)

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 [325, 341, 342]. Στον άνθρωπο, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τους υποδοχείς IL-1RI και IL-1RII έχουν χαρτογραφηθεί στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 2 [343].

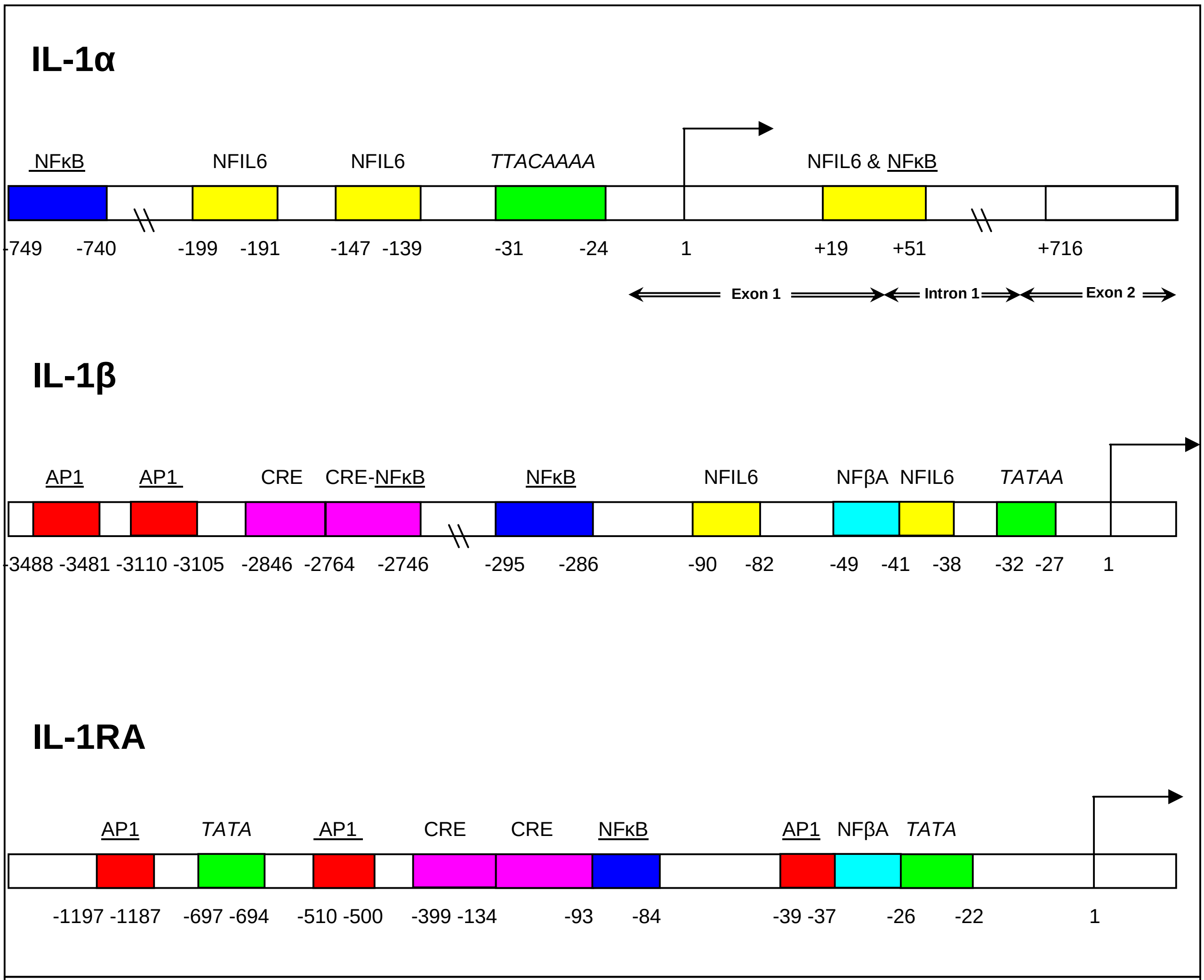
Το γονίδιο της IL-1

Η κλωνοποίηση και η εύρεση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδίου της IL-1β [344] επιτεύχθηκε το 1984. Έχει δημοσιευθεί ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδιώματος της ανθρώπινης IL-1α [345] και της IL-1β [346]. Στον άνθρωπο, το γονίδιο της IL-1α έχει μήκος περίπου 10 Kbp, ενώ το γονίδιο της IL-1β είναι περίπου 7 Kbp. Τα ανθρώπινα γονίδια της IL-1 έχουν χαρτογραφηθεί στην ίδια περιοχή του χρωμοσώματος 2 (2q13) [347]. 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 [346].

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 [348]. 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 καρβοξυ-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 ATTTA μοτίβου. Έχει βρεθεί ότι οι αλληλουχίες αυτές συμβάλλουν στην αποσταθεροποίηση της αντίστοιχης κυτοκίνης, καθώς και των mRNAs που κωδικοποιούν για κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια [349].

Υποκινητές του γονιδίου της IL-1



Εικόνα: Οι υποκινητές των γονιδίων των ιντερλευκινών. Σύγκριση των ρυθμιστικών περιοχών των υποκινητών των τριών ιντερλευκινών.

Η τρισδιάστατη διαμόρφωση των υποκινητών των τριών γονιδίων της IL-1 είναι διαφορετική. Ο υποκινητής του γονιδίου της IL-1α δε διαθέτει κουτί 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 NFkB, 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 NFbA [350].

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 (single nucleotide polymorphism, SNP) [267] (rs16944). Ο πολυμορφισμός αυτός είναι λειτουργικός και έχει συσχετισθεί με πληθώρα νοσημάτων. Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα για την επίδραση του πολυμορφισμού στην έκκριση της IL-1β [351-353]. Στις περισσότερες όμως μελέτες το αλλήλιο 2 αντιπροσωπεύει ένα φαινότυπο υπερέκκρισης της IL-1β.

IL-1B-511*1

- ✓ Έμφραγμα μυοκαρδίου [354]
- ✓ Ατροφία πολλαπλών συστημάτων [355]
- ✓ Βαρύτητα της σκλήρυνσης κατά πλάκας [356]
- ✓ Νόσος Parkinson [357] και πρώιμη έναρξη της νόσου [358].
- ✓ Ψωρίαση [359]
- ✓ Σχιζοφρένεια [360]
- ✓ Ψυχωτικά συμπτώματα σε ασθενείς με νόσο Alzheimer [361]

IL-1B-511*2

- ✓ Βαρύτητα της ελκώδους κολίτιδας [362].
- ✓ Συστηματικό ερυθηματώδη λύκο [363]
- ✓ Σύνδρομο Sjogren [364].
- ✓ Πυρετικοί σπασμοί σε παιδιά [365].
- ✓ Επιληψία κροταφικού λοβού και σκλήρυνση ιπποκάμπου [366]
- ✓ Νόσος Parkinson [367, 368]
- ✓ Προστατεύει από επαναστένωση των στεφανιαίων μετά από διαδερμική αγγειοπλαστική [369]

Πίνακας: Μερικές από τις συσχετίσεις του πολυμορφισμού IL-1β (-511 C/T) (rs16944)

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 [370]. Μελέτες έχουν δείξει σε ασθενείς με σοβαρή περιοδοντίτιδα ότι οι φορείς του αλληλομόρφου 2 της IL-1α (-889) έχουν αυξημένα επίπεδα της IL-1α στα φατνία [371], ενώ οι φυσιολογικοί μάρτυρες, οι οποίοι είναι 2/2 ομοζυγώτες, αντιπροσωπεύουν ένα φαινότυπο αυξημένης έκκρισης της IL-1β [372]. 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 [373]. 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 IL-1α πρωτεΐνης [373].

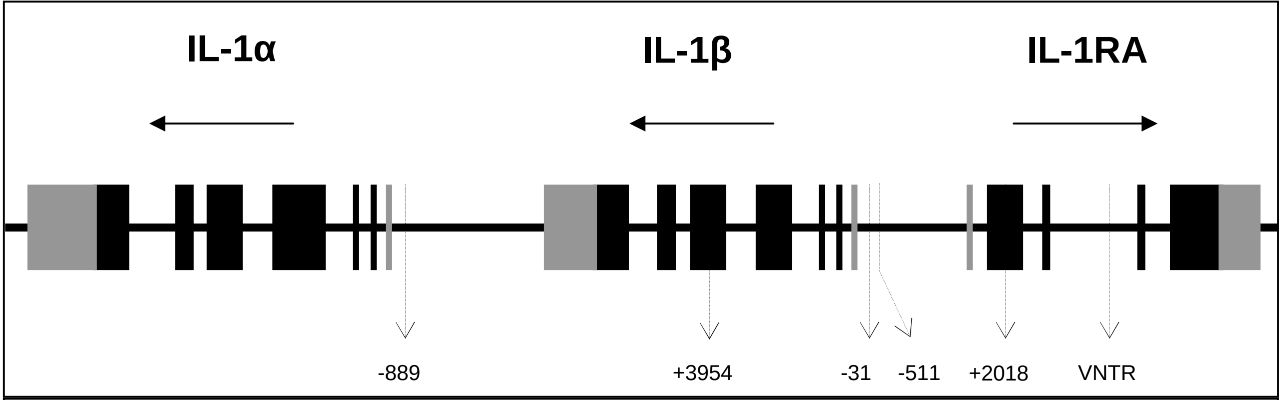
IL-1A-889*1

- ✓ Συστηματικός ερυθηματώδη λύκος [363]
- ✓ Νόσος Αδαμαντιάδη-Behcet [374]
- ✓ Σαρκοείδωση [375]
- ✓ Ψωριασική αρθρίτιδα [376]
- ✓ Πρώιμη έναρξη βαρείας μυασθένειας [377]

IL-1A-889*2

- ✓ Πρώιμη έναρξη της νόσου Alzheimer [378]
- ✓ Ισχαιμικό ΑΕΕ [379]
- ✓ Συστηματική σκλήρυνση [380]
- ✓ Ατροφία πολλαπλών συστημάτων [381]
- ✓ Νεανική ρευματοειδής αρθρίτιδα [370]

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



Εικόνα: Τα γονίδια των ιντερλευκινών με τους πιο συχνούς πολυμορφισμούς. Οι γκρι περιοχές αντιστοιχούν σε περιοχές που δεν μεταφράζονται.

Δράσεις της IL-1 στα νευρικά κύτταρα

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 το νευρωνικό θάνατο, όπως για παράδειγμα η αναστολή εισόδου των ιόντων Ca^{2+} στα νευρικά κύτταρα [382], η αναστολή της απελευθέρωσης του γλουταμικού [218], η αναστολή της μακροχρόνιας ευόδωσης (long-term potentiation) [383] και η αύξηση του GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ) [384]. 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) [385]. 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 [154].

Δράσεις της IL-1 στα κύτταρα της γλοίας

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η IL-1 προκαλεί την απελευθέρωση νευροτοξινών από τα κύτταρα της γλοίας, ιδίως τη μικρογλοία [147]. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς η φύση αυτών των ουσιών, αλλά υπάρχουν αναφορές για το ρόλο του νιτρικού οξειδίου [386], των πρωτεϊνών οξείας φάσης (όπως η πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς και η α1-αντιχυμοθρυψίνη) [59] και του συμπληρώματος [58].

Επίδραση της IL-1 σε άλλους υποπληθυσμούς της γλοίας, όπως τα αστροκύτταρα, συνεπάγεται την έκκριση νευροτροφικών παραγόντων [387].

IL-1 και απόπτωση των νευρικών κυττάρων

Διάφορα γονίδια και μετατρεπτικά ένζυμα των ιντερλευκινών (caspase) εμπλέκονται στους αποπτωτικούς μηχανισμούς του ΚΝΣ. Υπάρχουν ενδείξεις που φανερώνουν ότι η IL-1 συμμετέχει στην απόπτωση των νευρικών κυττάρων. Πειραματόζωα, τα οποία στερούνται την κασπάση 1 [160] (ένζυμο το οποίο ενεργοποιεί την IL-1β) ή η χορήγηση αναστολέων της [155] φαίνεται ότι μειώνει την έκταση της ισχαιμικής βλάβης.

IL-1 και βλάβη του αγγειακού τοιχώματος

Η IL-1 θεωρείται μια από τις πιο ισχυρές κυτοκίνες 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 [388] και αυξημένη έκφραση χυμοκινών [84], παραγόντων πήξης και αναστολέων ινοδόλυσης [389]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών [390] και την έκκριση διαφόρων άλλων κυτοκινών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τις λείες μυϊκές ίνες [388]. Λόγω αυτών των δράσεων η IL-1 έχει εμπλακεί στην παθοφυσιολογία διαφόρων καρδιαγγειακών νοσημάτων [391].

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 [392]. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η ανασυνδυασμένη IL-1RA αναστέλλει αποτελεσματικά τη δημιουργία αθηρωματικών αλλοιώσεων σε apoE$^{-/-}$ ποντίκια [393]. Επιπλέον, μια σειρά μελετών σε knockout ή διαγονιδιακά ποντίκια παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της IL-1 και της IL-1RA στην παθογένεια του αγγειακού τοιχώματος [394-398]. Έτσι, για παράδειγμα τα IL-1RA $^{+/-}$/ apoE$^{-/-}$ ποντίκια παρουσιάζουν σημαντικότερο αριθμό αγγειακών βλαβών σε σύγκριση με τα μη μεταλλαγμένα στελέχη [396].

Τέλος, σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη περιγράφηκε αυτόματη αρτηριακή φλεγμονή [399] 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 εντοπίζονταν 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 κυτοκινών 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 [400]. Η IL-1 [401] 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 [400]. 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 συσσώρευση των αιμοπεταλίων [402]. Μελέτες έδειξαν ότι οι θρομβωτικές ιδιότητες της IL-1 αναστέλλονται με τη χορήγηση αντιφλεγμονωδών ιντερλευκινών [403].

IL-1 και νευροπροστατευτικές δράσεις:

Έχει παρατηρηθεί ότι η IL-1 δεν είναι νευροτοξική in vivo 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) [387]. Επομένως, η IL-1 πιθανόν να επιδρά στη νευρωνική επιβίωση [142] ή το θάνατο [143] μέσω περίπλοκων μηχανισμών και της συμμετοχής διάφορων τύπων νευρικών κυττάρων [144]. 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.

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

Η IL-1RA παρουσιάζει 18% ομολογία αμινοξέων με την IL-1α και 26% ομολογία με την IL-1β. Η οικογένεια της IL-1RA περιλαμβάνει μια εξωκυττάρια ισομορφή (sIL-1RA) και τρεις ενδοκυττάριες ισομορφές (icIL-1RA1,2,3) [404].

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 πεπτίδιο 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 [405].

Δύο επιπρόσθετες ενδοκυττάριες μορφές της IL-1RA έχουν επίσης περιγραφεί [406]. 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΄NH_2-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 [407]. Αυτό το μόριο έχει βρεθεί σε μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ηπατικά κύτταρα. Πιθανό 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 [404].

Η παραγωγή της IL-1RA επάγεται από έναν αριθμό άλλων κυτοκινών, προϊόντα ιών και βακτηρίων, και πρωτεΐνες οξείας φάσης [408], φανερώνοντας ότι αυτή η κυτοκίνη πιθανόν να παράγεται in vivo σε πολυάριθμες χρόνιες φλεγμονώδεις και λοιμώδεις ασθένειες [404].

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 [404]', 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 [409].

Το γονίδιο της IL-1RA

Το ανθρώπινο γονίδιο της IL-1RA (IL1RN) έχει χαρτογραφηθεί στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 2, στην περιοχή q14-q21 [410]. Τα γονίδια για την IL-1α (IL-1A), IL-1β (IL-1B) και IL-1RA χαρτογραφούνται σ' ένα περιορισμένο 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.

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 σειράς επαναλήψεων (2-6 επαναλήψεις) σταθερής αλληλουχίας 86bp [410]. Έχουν περιγραφεί 5 αλλήλια και η επαναλαμβανόμενη αυτή αλληλουχία περιέχει τρεις περιοχές σύνδεσης πρωτεϊνών, οι οποίες φαίνεται να ευθύνονται για τη λειτουργικότητα του πολυμορφισμού.

`atcctggggaaagtgagggaaatatggacatcacatggaacaacatccaggagactcaggcctctaggagtaactgggtagtgtgc`

Πίνακας: Η αλληλουχία των 86 βάσεων που επαναλαμβάνεται στο 2ο ιντρόνιο του γονιδίου της IL-1RN και δημιουργεί τα 5 διαφορετικά αλληλόμορφα του VNTR πολυμορφισμού (rs2234663).

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται ο αριθμός των επαναλήψεων και τα χαρακτηριστικά του κάθε αλληλομόρφου:

Αλληλόμορφο	Αριθμός επαναλήψεων	Χαρακτηριστικά
1	4	Το πιο συχνό αλληλόμορφο
2	2	Σχετίζεται με παρατεταμένη φλεγμονή
3	3	Σπάνιο
4	5	Σπάνιο
5	6	Σπάνιο

Πίνακας: Τα αλληλόμορφα του γονιδίου της IL-1RA και ο αριθμός των επαναλήψεων τους.

Σε ένα φυσιολογικό Δυτικό πληθυσμό η συχνότητα του αλληλομόρφου 1 είναι περίπου 73%, 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 [351]. Από την άλλη πλευρά, τα μονοπύρηνα κύτταρα των φορέων του αλληλίου 2 έχουν μια αυξημένη ικανότητα να παράγουν IL-1RA πρωτεΐνη in vitro [411]. 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 [404] και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [412], γεγονός που εξηγεί τον συσχετισμό του αλληλίου 2 με μια μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων ασθενειών κυρίως επιθηλιακής ή ενδοθηλιακής προέλευσης [404]. Πρόσφατα αποδείχτηκε 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 αλληλίου 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 πιθανό 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 την απόπτωση των νευρικών κυττάρων.

Συσχέτιση του πολυμορφισμού της IL-1RA με άλλες νόσους

Το IL1RN*2 έχει συσχετιστεί με μια ποικιλία ανθρώπινων ασθενειών κυρίως φλεγμονώδους και αυτοάνοσης αρχής [404]. Σε πολλές από αυτές, το IL1RN*2 σχετίζεται με τη σοβαρότητα και όχι με την ευαισθησία και την προδιάθεση να αποκτήσει κάποιος τη νόσο.

- ✓ 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 ψωρίαση
- ✓ Ελκώδης κολίτιδα
- ✓ 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
- ✓ Νόσος του Grave’s

Πίνακας: Μερικές από τις νόσους με τις οποίες το IL1RN*2 αλλήλιο έχει συσχετιστεί

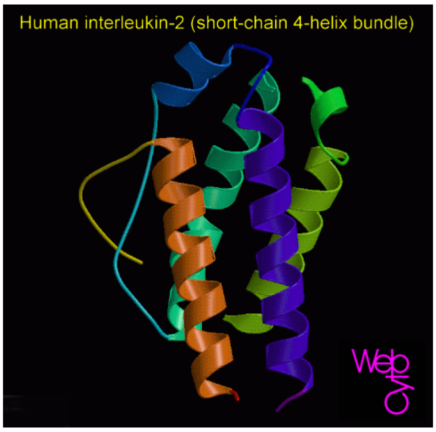
ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 2 (IL-2)

Δομή και Βιολογική δράση

Οι κυτοκίνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής ή χυμικής ανοσίας ταξινομούνται ανάλογα με τα παράγωγά τους σε υποομάδες των CD4^{+}T βοηθητικών κυττάρων, είτε ως Th1 ή ως Th2. Τα Th1 κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο κυρίως στην κυτταρική απόκριση και εκκρίνουν την IL-2, την IL-12 και την INF-γ. Τα Th2 κύτταρα λαμβάνουν μέρος στην χυμική ανοσία και εκκρίνουν την IL-4, την IL-6 και την IL-10. Ωστόσο, νεότερες μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι κυτοκίνες διαθέτουν πολλαπλές κυτταρικές πηγές, έχουν ποικίλες βιολογικές λειτουργίες και παράγονται τόσο από τα φλεγμονώδη όσο και από τα ενδογενή παρεγχυματικά κύτταρα έχουν οδηγήσει στη διεύρυνση του παραδοσιακού αυτού συστήματος ταξινόμησης. Έτσι, οι κυτοκίνες μπορούν επίσης να διαχωριστούν ανάλογα με το ρόλο τους είτε σε προ-φλεγμονώδεις είτε σε αντι-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Οι Th1 κυτοκίνες (IL-2, IL-12, και IFN-γ) έχουν προ-φλεγμονώδη δράση και ενεργοποιούνται κατά την οξεία φάση της φλεγμονώδους αντίδρασης, ενώ οι Th2 κυτοκίνες (IL-4, IL-6, και IL-10) έχουν ανοσοκατασταλτική δράση.

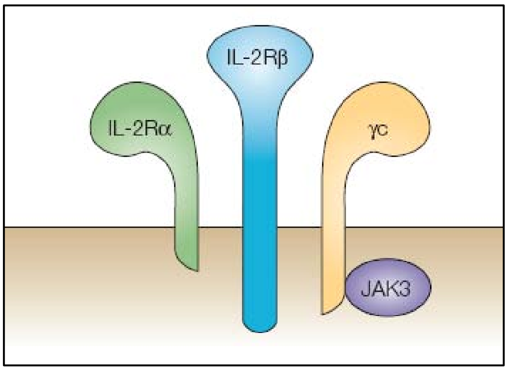
Η IL-2 είναι μια κυτοκίνη με 4 αντιπαράλληλες α-έλικες (four-bundle α-helical cytokine) που παράγεται κατά κύριο λόγο από τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα και ασκεί τη βιολογική της δράση μέσω πρόσδεσης στον υψηλής συγγένειας υποδοχέα της (IL-2R). Η πρωτεΐνη της IL-2 υφίσταται εκτεταμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, που περιλαμβάνει διάσπαση, γλυκοσυλίωση και σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της βιολογικά ενεργής της μορφής. Η IL-2 του ανθρώπου και του ποντικιού έχουν 63% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης.

Εικόνα: Κρυσταλλική δομή της IL-2 στον άνθρωπο



Υποδοχέας της IL-2 (IL-2R)

Ο υποδοχέας της IL-2 (IL-2R) αποτελεί τον πρώτο υποδοχέα ιντερλευκίνης που περιγράφηκε και ταυτοποιήθηκε [413]. Διαθέτει περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη υψηλής συγγένειας και εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα (T cells). Αποτελείται από 3 ξεχωριστές υπομονάδες την α-αλυσίδα (IL-2Rα ή CD25), τη β-αλυσίδα (IL-2Rβ ή CD122) και τη γ-αλυσίδα (γ_c ή CD132), καθεμιά από τις οποίες συμμετέχει στην πρόσδεση της IL-2 [414].



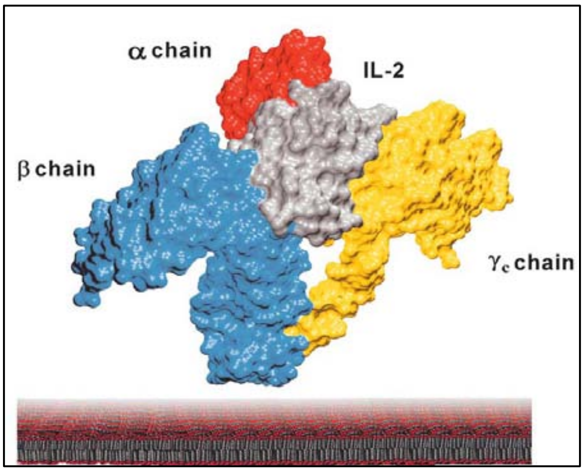
Εικόνα: Ο υποδοχέας υψηλής συγγένειας της IL-2 (IL-2R) αποτελείται από 3 ξεχωριστές αλυσίδες: την α-αλυσίδα (IL-2Rα), τη β-αλυσίδα (IL-2Rβ) και τη γ-αλυσίδα (γ_c). Απουσία IL-2, οι αλυσίδες του IL-2R υποδοχέα δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Σχέση δομής και δράσης της αλληλεπίδρασης IL-2/IL-2R

Μελέτες έχουν δείξει ότι η α-αλυσίδα του IL-2R υποδοχέα συνδέεται στη β-αλυσίδα, προτού λάβει χώρα η αλληλεπίδραση IL-2/IL-2R. Μετά τη σύνδεση της IL-2 στο αβ ετεροδιμερές, η γ-αλυσίδα συνδέεται στο σύμπλοκο IL-2/IL-2R, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός σταθερού τετραμερούς μακρομορίου [415].

Επίσης, έχει ταυτοποιηθεί η τρισδιάστατη δομή των τριών αλυσίδων του IL-2R υποδοχέα κατά την πρόσδεση της IL-2 [301, 416]. Οι περιοχές του μορίου της IL-2 που αλληλεπιδρούν με τις τρεις αλυσίδες του υποδοχέα δεν επικαλύπτονται, εκτός από μια μικρή περιοχή σημαντικής λειτουργίας. Το μόριο της IL-2 αποτελείται από 4 αντιπαράλληλες α-έλικες, όπως έχει ειπωθεί παραπάνω, και προσδένεται ανάμεσα στη β- και γ-αλυσίδα, οι οποίες συγκλίνουν σχηματίζοντας μια φουρκέτα (ένα Y σχήμα). Η IL-2 συνδέεται στο εσωτερικό της φουρκέτας. Η άλλη πλευρά του μορίου της IL-2 συνδέεται στην α-αλυσίδα του υποδοχέα IL-2R. Με την πρόσδεση της IL-2, η β-αλυσίδα υφίσταται μια αλλαγή διαμόρφωσης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγγένεια σύνδεσής της στη γ-αλυσίδα, σχηματίζοντας ένα σταθερό τετραμερές μοριακό σύμπλοκο.

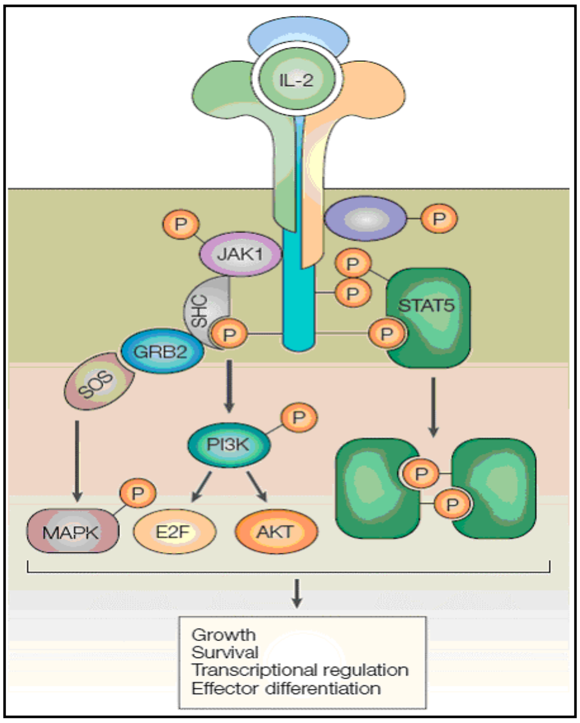
Εικόνα: Απεικόνιση ενός μοντέλου σχηματισμού του συμπλόκου IL-2/IL-2R κατά τη μεταγωγή σήματος.



Μονοπάτι μεταγωγής σήματος της IL-2

Οι τρεις αλυσίδες του IL-2R υποδοχέα μεταφέρουν τα εξωκυττάρια βιοχημικά σήματα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου. Η πρόσδεση της IL-2 στην IL-2Rα αλυσίδα επάγει τη σύνδεση της υπομονάδας αυτής με την IL-2Rβ και τη γ_c αλυσίδα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός σταθερού ετεροτριμερούς και την έναρξη της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος.

Εικόνα: Μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω του IL-2R υποδοχέα. Η IL-2Rα αλυσίδα δε συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος, ενώ η IL-2Rβ αλυσίδα σχηματίζει σύμπλοκο με το ένζυμο JAK1, μια κινάση που προσθέτει φωσφορικές ομάδες σε κατάλοιπα tyr. Παρόμοια, η γ_C αλυσίδα σχηματίζει σύμπλοκο με μια άλλη κινάση tyr, την JAK3. Αυτά τα ένζυμα ενεργοποιούνται μετά την πρόσδεση της IL-2 στις εξωκυττάριες περιοχές του IL-2R υποδοχέα, με αποτέλεσμα την επαγωγή τριών ενδοκυττάριων μονοπατιών μεταγωγής σήματος: το μονοπάτι της MAP κινάσης, το PI3K μονοπάτι, και το JAK-STAT μονοπάτι.



Τα μόρια της JAK3 κινάσης [417, 418] (Janus activated kinase 3) που προσδένονται στη γ_c αλυσίδα, και τα μόρια της JAK1 κινάσης που αλληλεπιδρούν με την IL-2Rβ αλυσίδα, αυτο-φωσφορυλιώνονται και φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα tyr στην κυτταροπλασματική περιοχή των αλυσίδων, με τις οποίες αλληλεπιδρούν. Αυτό επάγει την πρόσδεση της SHC πρωτεΐνης (SRC-homology-2-domain-containing transforming protein C) και του STAT5 μεταγραφικού παράγοντα (signal transducer and activator of transcription) στην κυτταροπλασματική περιοχή της IL-2Rβ αλυσίδας. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο της SHC πρωτεΐνης προκαλεί την ενεργοποίηση των MAPK (mitogen activated protein kinase) [419] και PI3K-AKT μονοπατιών (phosphatidylinositol 3-kinase) [420]. Τέλος, τα κατάλοιπα tyr του STAT5 μεταγραφικού παράγοντα φωσφορυλιώνονται, με αποτέλεσμα το διμερισμό του και τη μεταφορά του στο εσωτερικό του πυρήνα, όπου ρυθμίζει την έκφραση των κατάλληλων ‘γονιδίων-στόχων’ [421].

Ρόλος της IL-2 στην ανοσία και την παθογένεση

Η IL-2 παράγεται αποκλειστικά από τα T κύτταρα, και συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωσή τους, καθώς και στη ρύθμιση της ομοιόστασης και της ανοχής τους (T cell tolerance). Η αυτοκρινής και παρακρινής δράση της IL-2 στα CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα επάγει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, μέσω της ικανότητάς της να προάγει την έναρξη της φάσης S του κυτταρικού κύκλου [422, 423]. Επιπλέον, η IL-2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση των CD4+CD25+T ρυθμιστικών κυττάρων (T_{reg}) [424, 425], καθώς και στον κυτταρικό θάνατο των T κυττάρων (AICD: activation-induced cell death) [426]. Επίσης, η IL-2 επάγει τον πολλαπλασιασμό των NK (natural killer cells) και B κυττάρων, και ενισχύει την παραγωγή αντισωμάτων κατά τη διάρκεια χυμικών αποκρίσεων [427]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι η IL-2 εμπλέκεται στην ανάπτυξη των T κυττάρων στον θύμο αδένα [428, 429].

Η IL-2 συμμετέχει σε μια σειρά οξειών και χρόνιων παθολογικών καταστάσεων, λόγω της φύσης και του ρόλου της στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ρύθμιση των T κυττάρων. Σ’ αυτές περιλαμβάνεται η λευχαιμία, η φλεγμονώδης νόσος, η αυτοανοσοποιητική νόσος, καθώς και η παθογένεση που προκαλείται από την παρουσία ιών, όπου η έκφραση της IL-2 απορυθμίζεται. Έχει δειχθεί ότι ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου της IL-2 αναπτύσσουν ένα φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα, και δεν εκδηλώνουν κάποιας μορφής ανοσοανεπάρκεια. Ωστόσο, τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν λεμφοειδή υπερπλασία (lymphoid hyperplasia) και παράγουν μεγάλες ποσότητες αυτο-αντισωμάτων, καταλήγοντας σε παθολογικές καταστάσεις, όπως αιμολυτική αναιμία, χρόνια φλεγμονώδης νόσος του εντέρου [430] και σοβαρή μορφή αυτοανοσίας, που παρατηρείται σε ποντίκια γεροντικής ηλικίας [431, 432]. Επίσης, η έλλειψη του γονιδίου της IL-2 έχει συσχετιστεί με απουσία CD4+CD25+T ρυθμιστικών κυττάρων (T_{reg}) και ανώμαλο κυτταρικό θάνατο των T κυττάρων (AICD), που πιθανό να συνεισφέρουν στα αυξημένα επίπεδα αυτο-φορτισμένων λεμφοκυττάρων και στη μη-ελεγχόμενη συσσώρευση Τ κυττάρων στην περιφέρεια [426, 433]. Επομένως, η IL-2 παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των Τ κυττάρων και στη ρύθμιση της ανοχής τους στην περιφέρεια (peripheral tolerance).

Η απορύθμιση της έκφρασης της IL-2 επάγει την εκδήλωση φλεγμονωδών αντιδράσεων και τη δυσλειτουργία των ανοσοποιητικών κυττάρων που παρατηρούνται σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως η πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE-experimental autoimmune encephalomyelitis) στα ποντίκια [434], η νόσος του Crohn [435], η ρευματοειδής αρθρίτιδα [436], ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I [437], και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (SLE-systemic lupus erythematosus) [438]. Ωστόσο, οι παθογενετικοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την εκδήλωση των παθολογικών αυτών καταστάσεων δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί. Τέλος, η ανώμαλη έκφραση της IL-2 εμπλέκεται σε ορισμένες μορφές λευχαιμίας, όπως η λευχαιμία των Τ κυττάρων που εμφανίζεται σε εφήβους και σχετίζεται με τη λευχαιμία των Τ κυττάρων τύπου 1, που προκαλείται από ιική μόλυνση (HTLV-I-human T cell leukemia virus type 1)[439],[383].

Ρόλος της IL-2 στο ΚΝΣ

Η IL-2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της ανοσοποιητικής απόκρισης, που επάγεται από την παρουσία διαφόρων ξενιστών. Οι κυριότερες δράσεις της περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων (natural killer cells) [440], και την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων [441]. Εντός του ΚΝΣ, η IL-2 συμβάλλει στην επιβίωση και την ανάπτυξη των κυτταρικών πληθυσμών, την απελευθέρωση και τη μεταφορά ορμονών και την τροποποίηση των βιοηλεκτρικών δραστηριοτήτων [442]. Επίσης, η IL-2 πιθανό να επιδρά στη ρύθμιση του ύπνου και τη διεγερσιμότητα, σε λειτουργίες της μνήμης, στην κινητικότητα και την τροποποίηση του νευροενδοκρινικού άξονα. Τέλος, μελέτες σε αρουραίους φανερώνουν ότι η IL-2 επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων εντός του ΚΝΣ [443], χωρίς όμως να συμβάλλει στην παραγωγή νευροτροφινών ή την αναγέννηση των νευρωνικών πληθυσμών.

Ρύθμιση της σύνθεσης της IL-2

Στον ανθρώπινο εγκεφαλικό ιστό δεν έχει περιγραφεί ενδογενής κυτταρική πηγή IL-2. Η παραγωγή της IL-2 επάγεται μετά από ρήξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τη διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων [346] μετά από ΚΕΚ. Σε διάφορες μελέτες σε πειραματόζωα που υπέστησαν ΚΕΚ, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση IL-2 κατά τη διάρκεια της πρώιμης περιόδου μετά την κάκωση [444]. Επίσης, μελέτες σε τρωκτικά που υπέστησαν ΕΑΕ (experimental autoimmune encephalomyelitis) έδειξαν αυξημένα επίπεδα IL-2 (πρωτεΐνη και mRNA μετάγραφα) εντός του ΚΝΣ κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου και μειωμένα επίπεδα στο στάδιο της έκβασης μετά τη νόσο [445, 446]. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες σε άτομα νεαρής ηλικίας που υπέστησαν ΚΕΚ φανερώνουν ότι δεν παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα της IL-2 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) των ασθενών μετά από ΚΕΚ [346]. Παρόλα αυτά, αυξημένα επίπεδα IL-2 ανιχνεύτηκαν στο ΕΝΥ ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας, μια αυτοάνοση νόσο, στην οποία η διείσδυση των λευκοκυττάρων παίζει κυρίαρχο ρόλο [447, 448].

Το γονίδιο της IL-2

Το ανθρώπινο γονίδιο της IL-2 έχει χαρτογραφηθεί στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 4, στην περιοχή q26-q27 [449]. Η μεταγραφή του γονιδίου της IL-2, που παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων, ρυθμίζεται από τη συντονισμένη δράση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-AT (nuclear factor of activated T cells) παράγοντας, η AP-1 πρωτεΐνη (activated protein-1), ο NF-kB παράγοντας (nuclear factor kB), και η οκταμερής πρωτεΐνη 1 (Oct-1)[450]. Έχει βρεθεί ότι ο υποκινητής του γονιδίου της IL-2 περιέχει τουλάχιστον δύο περιοχές πλούσιες σε πουρίνες, όπου προσδένονται μέλη της οικογένειας του NF-AT παράγοντα [451]. Η ακραία περιοχή του υποκινητή συνδέεται με υψηλή συγγένεια με ένα σύμπλοκο που σχηματίζεται από πρωτεΐνες του NF-AT παράγοντα και ένα διμερές των Jun και Fos πρωτεϊνών. Τα ομοδιμερή των c-Jun πρωτεϊνών ή τα ετεροδιμερή c-Jun/c-Fos σταθεροποιούν την πρόσδεση του NF-AT παράγοντα στο DNA. Η ενεργοποίηση των διαφορετικών αυτών μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζει τη μεταγραφή του γονιδίου της IL-2, που προέρχεται από τη συνεργική επαγωγή τουλάχιστον δύο μονοπατιών μεταγωγής σήματος του υποδοχέα των Τ κυττάρων (TcR υποδοχέας). Το ένα απαιτεί τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του PLCγ1 ενζύμου (phospholipase C-γ-1) [452, 453], ενώ στο δεύτερο μονοπάτι είναι απαραίτητη η δράση της G-πρωτεΐνης $p21^{ras}$ [454, 455], με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-AT παράγοντα, τη μεταφορά του στο εσωτερικό του πυρήνα και την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου της IL-2 [450].

Το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα της IL-2 (IL-2R) αποτελείται από 8 εξόνια, που καταλαμβάνουν μια περιοχή 25Kb στο χρωμόσωμα 10. Το 2ο και 4ο εξόνιο προέρχονται από διπλασιασμό γονιδίου [456]. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την IL-2Rα αλυσίδα εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10, στην περιοχή p15.1, το γονίδιο της IL-2Rβ αλυσίδας στο χρωμόσωμα 22, στην περιοχή q13, και το γονίδιο της IL-2Rγ αλυσίδας έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα X, στην περιοχή q13 [457].

Πολυμορφισμοί στο ανθρώπινο γονίδιο της IL-2

Υπάρχει ένας πολυμορφισμός στο γονίδιο της IL-2 που εντοπίζεται στην περιοχή -384 του υποκινητή του γονιδίου της IL-2 [458], όπου παρατηρείται αλλαγή βάσης από γουανίνη (G) σε θυμίνη (T). Ο πολυμορφισμός αυτός έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων και κατά συνέπεια την παραγωγή της IL-2. Έχουν περιγραφεί δύο αλλήλια: αλλήλιο G (παρουσία γουανίνης), αλλήλιο T (παρουσία θυμίνης). Σε μια μελέτη της παραγωγής κυτοκινών σε ενεργοποιημένα περιφερικά λεμφοκύτταρα, βρέθηκε ότι οι ομοζυγώτες για το G αλλήλιο (G/G) στη θέση -384 του υποκινητή του γονιδίου της IL-2 είχαν τριπλάσια επίπεδα IL-2 σε σύγκριση με τους ετεροζυγώτες G/T και ομοζυγώτες T/T [361].

Ένας άλλος πολυμορφισμός εντοπίζεται εντός του 1^{ου} εξονίου του γονιδίου της IL-2, στην περιοχή +114 από το κωδικόνιο έναρξης [459]. Έχουν περιγραφεί δύο αλλήλια: αλλήλιο G (παρουσία γουανίνης), αλλήλιο T (παρουσία θυμίνης). Πρόκειται για μια σιωπηλή μετάλλαξη, μιας και δεν οδηγεί σε αλλαγή στο αμινοξύ της τριπλέτας που περιέχει τον πολυμορφισμό, και κατά συνέπεια είναι άνευ λειτουργικής σημασίας.

Σε φυσιολογικούς Καυκάσιους πληθυσμούς, η συχνότητα του T αλληλίου για τον πολυμορφισμό του υποκινητή του γονιδίου της IL-2 είναι περίπου 73%, ενώ η συχνότητα του G αλληλίου κυμαίνεται στο 27% [458, 460]. Ωστόσο, η κατανομή των αλληλίων διαφέρει στις διάφορες φυλές.

Συσχέτιση των πολυμορφισμών της IL-2 με άλλες νόσους

Ποικίλες μελέτες έχουν διερευνήσει τη συσχέτιση των δύο πολυμορφισμών του ανθρώπινου γονιδίου της IL-2 με την ευαισθησία στην εμφάνιση της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Πιο συγκεκριμένα, σε μια μελέτη ισπανικού πληθυσμού, βρέθηκε ότι δύο γονότυποι (T/G, T/T) του πολυμορφισμού που εντοπίζεται στην -384 περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της IL-2 σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία για εμφάνιση της δευτεροπαθώς προϊούσας μορφής της σκλήρυνσης κατά πλάκας [461].

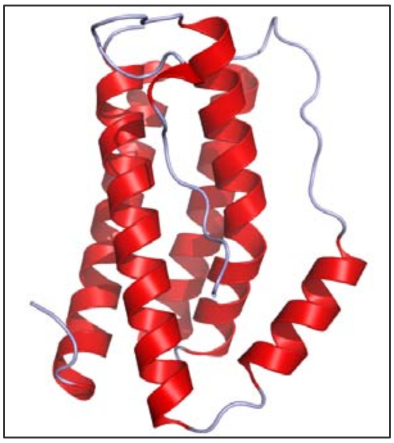
Τα ευρήματα αυτά φανερώνουν ότι η πολυμορφική αυτή περιοχή του γονιδίου πιθανό να σχετίζεται και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι ο γονότυπος (T/T) του -384 πολυμορφισμού σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ατροφίας στομάχου μέσω μόλυνσης από το βακτήριο Helicobacter pylori και πιθανό να συνδέεται με αυξημένη προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου [462]. Επίσης, ο γονότυπος αυτός σχετίζεται με τη σοβαρότητα στην εμφάνιση περιοδοντικής νόσου [463]. Σε μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η παρουσία ενός τουλάχιστον G αλληλίου στους γονότυπους του -384 πολυμορφισμού σχετίζεται με διπλάσιο κίνδυνο απόρριψης μοσχεύματος (graft-versus-host-disease) σε δέκτες μυελού των οστών με διαφορετική αντιγονική σύσταση [464]. Τέλος, μελέτες φανερώνουν ότι δεν υπάρχει γενετική συσχέτιση των πολυμορφισμών που παρατηρούνται στο γονίδιο της IL-2 με τη σοβαρότητα και την ευαισθησία στην ανάπτυξη ρευματοειδούς αρθρίτιδας [465].

ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 6 (IL-6)

Δομή και Βιολογική δράση

Η επιβίωση, η διαφοροποίηση και η λειτουργία των νευρώνων ρυθμίζεται από τροφικά μόρια. Έχουν ταυτοποιηθεί πολλές οικογένειες τροφικών μορίων, μεταξύ των οποίων και η οικογένεια της IL-6. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από τον CNTF παράγοντα (ciliary neurotrophic factor), τον LIF παράγοντα (leukemia inhibitory factor), την ογκοστατίνη Μ, την καρδιοτροφίνη-1 (CT-1), τον GPA (growth promoting activity), την IL-6 και την IL-11 [466]. Η IL-6, όπως και όλα τα μέλη της οικογένειας, έχει ΜΒ 20-24KDa στη μη-γλυκοσυλιωμένη της μορφή. Η ομολογία των αμινοξέων μεταξύ των κυτοκινών αυτών είναι πολύ χαμηλή και δεν ξεπερνά το 30%. Ωστόσο, η τριτοταγή τους δομή αποτελείται από τέσσερις αντιπαράλληλες α-έλικες, καταλήγοντας σε μια όμοια τρισδιάστατη διαμόρφωση.

Εικόνα: Κρυσταλλική δομή της IL-6 στον άνθρωπο

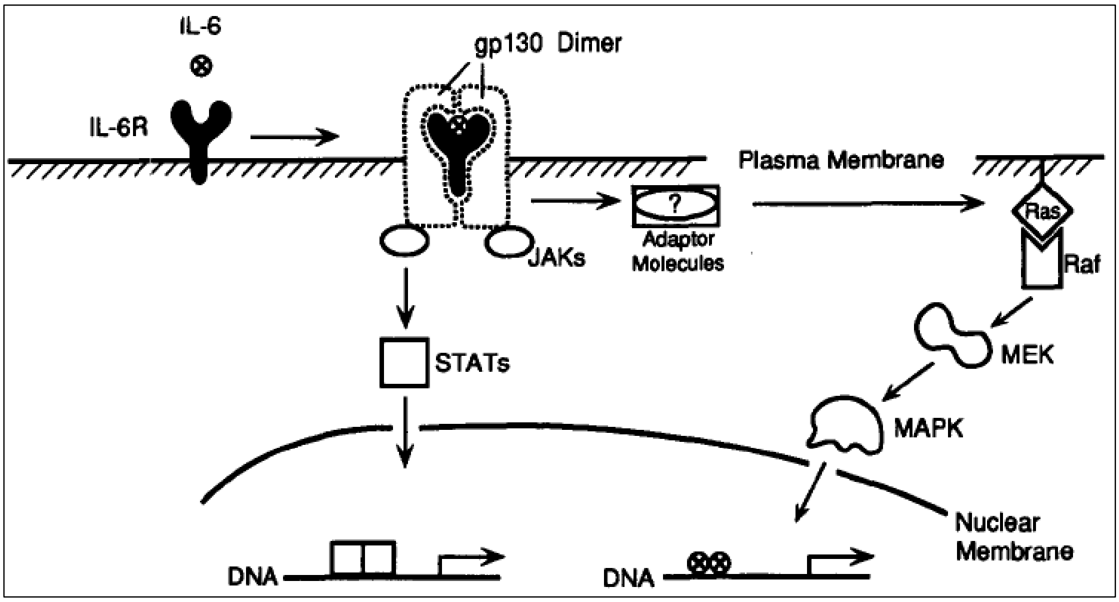


Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της οικογένειας αυτής των κυτοκινών, είναι ότι συμμετέχει σε πολλές διαφορετικές διεργασίες. Αυτές περιλαμβάνουν την αιμοποίηση, την ανοσολογική απάντηση, καθώς και την ασυμπτωματική φλεγμονώδη αντίδραση [467].

Μονοπάτι μεταγωγής σήματος της IL-6

Η IL-6 συνδέεται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων κυτοκινών τύπου Ι. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από τέσσερα καλά διατηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης στο Ν-τελικό άκρο του μορίου τους, και ένα μοτίβο τρυπτοφάνης-σερίνης-Χ-τρυπτοφάνης-σερίνης (WSXWS) που εντοπίζεται στην διαμεμβρανική περιοχή. Επιπλέον, δύο επαναλήψεις φιμπρονεκτίνης III (fibronectin III) βρίσκονται στην εξωκυττάρια περιοχή [466].

Το σύμπλοκο της IL-6 και του ειδικού υποδοχέα της αλληλεπιδρά με δύο gp130 μόρια, τα οποία είναι απαραίτητα για το μονοπάτι των ενδοκυττάριων αντιδράσεων [296, 468-470]. Ο διμερισμός των gp130 μορίων, επάγει την ενεργοποίηση των ενδοκυττάριων κινασών τυροσίνης της οικογένειας των Janus κινασών (JAKs). Στη συνέχεια, οι JAKs κινάσες προκαλούν τη φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων της STAT οικογένειας (signal transducers and activators of transcription), οι οποίοι εισέρχονται στον πυρήνα και ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου της IL-6. Επίσης, η IL-6 ενεργοποιεί ένα άλλο ενδοκυττάριο μονοπάτι, στο οποίο συμμετέχει η G-πρωτεΐνη Ras, με αποτέλεσμα την επαγωγή των MAPKs κινασών (mitogen-activated protein kinases). Οι MAPKs κινάσες προκαλούν τη φωσφορυλίωση διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων στα κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης.



Εικόνα: Μονοπάτι μεταγωγής σήματος της IL-6. Η IL-6 συνδέεται στον υποδοχέα της, και το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με δύο gp130 μόρια. Ο διμερισμός των δύο gp130 μορίων καταλήγει στην ενεργοποίηση των κυτταροπλασματικών κινασών τυροσίνης της JAK οικογένειας και στην επακόλουθη φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων STATs. Ένα εναλλακτικό μονοπάτι περιλαμβάνει τις ras και raf πρωτεΐνες, καταλήγοντας στην ενεργοποίηση της κινάσης θρεονίνης της οικογένειας των MAP κινασών, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων.

Διαλυτοί υποδοχείς της IL-6

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του μονοπατιού μεταγωγής σήματος της IL-6 είναι ο ρόλος του διαλυτού της υποδοχέα, ο οποίος μπορεί να απομακρυνθεί από την κυτταρική επιφάνεια με πρωτεόλυση [471-473]. Στη μορφή αυτή, ο διαλυτός υποδοχέας μπορεί να συνδεθεί με την IL-6 με υψηλή συγγένεια σύνδεσης. Σε αντίθεση με άλλους διαλυτούς υποδοχείς κυτοκινών, το σύμπλοκο IL-6/διαλυτού της υποδοχέα μπορεί να αλληλεπιδράσει με το gp130 μόριο σε κύτταρα-στόχους, ενεργοποιώντας το μονοπάτι μεταγωγής σήματος της IL-6. Επομένως, κύτταρα που εκφράζουν το gp130 μόριο και συστατικά του ενδοκυττάριου μονοπατιού, αλλά στερούνται του υποδοχέα της IL-6, μπορούν να ενεργοποιηθούν από το σύμπλοκο διαλυτού υποδοχέα της IL-6/IL-6 (trans-signalling pathway).

Ρόλος της IL-6 στο ΚΝΣ

Η IL-6 και ο υποδοχέας της εκφράζονται σε ειδικούς νευρωνικούς πληθυσμούς σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου [90, 474-478]. Περιοχές με υψηλά επίπεδα mRNA IL-6 και του υποδοχέα της είναι ο ιππόκαμπος, ο νεοφλοιός, και η παρεγκεφαλίδα [476]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι και τα αστροκύτταρα εκφράζουν τα γονίδια της IL-6 και του υποδοχέα της [478]. Μελέτες φανερώνουν ότι η έκφραση του mRNA της IL-6 και του υποδοχέα της παρουσιάζει διακύμανση κατά τις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης [474, 475]. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη γέννηση και την ενήλικη ζωή, παρατηρήθηκε συσσώρευση και των δύο μεταγράφων στο ραβδωτό σώμα και τον ιππόκαμπο, ενώ στον νεοφλοιό και τον υποθάλαμο μόνο το mRNA του υποδοχέα ήταν σε υψηλά επίπεδα. Αντίθετα, δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα των mRNAs στην παρεγκεφαλίδα, τη γέφυρα και τον προμήκη μυελό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της IL-6 στο ΚΝΣ δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί.

Ρύθμιση της σύνθεσης της IL-6

Νευρώνες: Σε μια μελέτη βρέθηκε ότι το mRNA της IL-6 και η πρωτεΐνη επάγονται από την IL-1β και τον TNF-α παράγοντα. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η επαγωγή αυτή είναι δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη και αναστέλλεται από την παρουσία IL-1RA και αντισωμάτων ενάντια στον TNF-α παράγοντα, αντίστοιχα [479].

Αστροκύτταρα: Είναι γνωστό ότι τα αστροκύτταρα αποτελούν κύρια πηγή παραγωγής IL-6 [480]. Επίσης, έχουν αναγνωριστεί διάφοροι παράγοντες που ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση της IL-6 στα αστροκύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, η IL-1β, ο

TNF-α παράγοντας και η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) επάγουν τη σύνθεση της IL-6 [481-483]. Σε αντίθεση με τους νευρώνες, η σύνθεση της IL-6 στα αστροκύτταρα μπορεί να προκληθεί από παθογόνα ιών και βακτηρίων (LPS: lipopolysaccharide) [484, 485], νευροδιαβιβαστές (νοραδρεναλίνη, ισταμίνη), και νευροπεπτίδια (VIP: vasoactive intestinal polypeptide, SP: substance P) [486-488]. Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος, με το οποίο ρυθμίζεται η σύνθεση της IL-6 στα κύτταρα του εγκεφάλου περιλαμβάνει τη συμμετοχή του κυκλικού AMP (cyclic AMP) με επακόλουθη ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Επίσης, η σύνθεση της IL-6 στα εγκεφαλικά κύτταρα μπορεί να προκληθεί από την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) [481].

<u>Μικρογλοία</u>: Τα κύτταρα της μικρογλοίας αποτελούν κύρια πηγή παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας από παθογόνα ιών και βακτηρίων και φλεγμονώδεις παράγοντες προκαλεί τη σύνθεση και απελευθέρωση της IL-6 [91, 489-491]. Οι μηχανισμοί ελέγχου και ρύθμισης της σύνθεσης της IL-6 είναι όμοιοι στα κύτταρα της μικρογλοίας, τα αστροκύτταρα και τους νευρώνες. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι πιθανώς να υπάρχει μια επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων και των κυττάρων της γλοίας, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφάλου και της νευρωνικής διαφοροποίησης, αλλά και σε παθολογικές διεργασίες που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης και της νευροεκφύλισης του ΚΝΣ.

Πίνακας: Παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση της IL-6 στο ΚΝΣ.

Κυτταρική πηγή	Παράγοντες ρύθμισης
Νευρώνες	Κυτοκίνες (IL-1β, TNF-α) Παθογόνα ιών και βακτηρίων
Αστροκύτταρα	Κυτοκίνες (IL-1β, TNF-α, IFN-γ) Νευροδιαβιβαστές/Νευροπεπτίδια (νοραδρεναλίνη, ισταμίνη, SP, VIP)
Μικρογλοία	Παθογόνα ιών και βακτηρίων Κυτοκίνες

Βιολογική δράση της IL-6 στο ΚΝΣ

<u>Επαγωγή της νευρωνικής επιβίωσης</u>: Πολλές in vitro και in vivo μελέτες φανερώνουν ότι η IL-6 έχει προστατευτική δράση στους νευρωνικούς πληθυσμούς του ΚΝΣ [492-494]. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η IL-6 συμβάλλει στην επιβίωση των χολινεργικών νευρώνων του μετωπιαίου λοβού και του διαφράγματος, καθώς και των κατεχολαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκέφαλου. Επίσης, μελέτες σε καλλιέργειες νευρώνων του ιππόκαμπου φανερώνουν ότι η IL-6 προστατεύει τα κύτταρα αυτά από

τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το γλουταμινικό οξύ [495]. Παρόμοια, σε in vivo μελέτες αρουραίων βρέθηκε ότι η IL-6 μετριάζει τη νευροτοξική δράση της NMDA τοξίνης (N-methyl-D-aspartate) στους χολινεργικούς νευρώνες του ραβδωτού σώματος [131]. Ο μηχανισμός της προστατευτικής δράσης της IL-6 εναντία στην τοξικότητα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο, υποστηρίζεται ότι η αλληλεπίδραση της IL-6 με συστήματα μεταφοράς Ca^{2+} πιθανό να συμβάλλει στη νευροπροστατευτική της δράση [496, 497].

Νευρωνική διαφοροποίηση: Σε μια in vitro μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η IL-6 επάγει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρωνικών πληθυσμών, κατά τρόπο ανάλογο με τη δράση του NGF παράγοντα (nerve growth factor) [498]. Με τον τρόπο αυτό, η IL-6 πιθανό να αληλεπιδρά με τον NGF παράγοντα, επάγοντας τη νευρωνική διαφοροποίηση [499-501].

Βιολογική δράση στα κύτταρα της γλοίας: Η IL-6 επάγει τον πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων in vitro [502] και in vivo [133, 503-505]. Έτσι, τα υψηλά επίπεδα IL-6 πιθανό να συνεισφέρουν στην επαγωγή της αστρογλοίωσης. Επίσης, σε καλλιέργειες αστροκυττάρων παρατηρήθηκε ότι η IL-6 ενεργοποιεί τη σύνθεση και την απελευθέρωση του NGF παράγοντα [506].

IL-6 και ρύθμιση της θερμοκρασίας του εγκεφάλου: Η IL-6 είναι μια ενδογενής πυρετογόνος ουσία [178]. Έχει βρεθεί ότι η τοπική παραγωγή της κυτοκίνης αυτής στον υποθάλαμο (μέσω IL-1β, TNF-α) [179, 180] ενεργοποιεί τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίου (HPA axis: hypothalamic-pituitary-adrenal axis), ρυθμίζοντας σημαντικές λειτουργίες, όπως τον πυρετό, τον ύπνο και την πρόσληψη της τροφής [507].

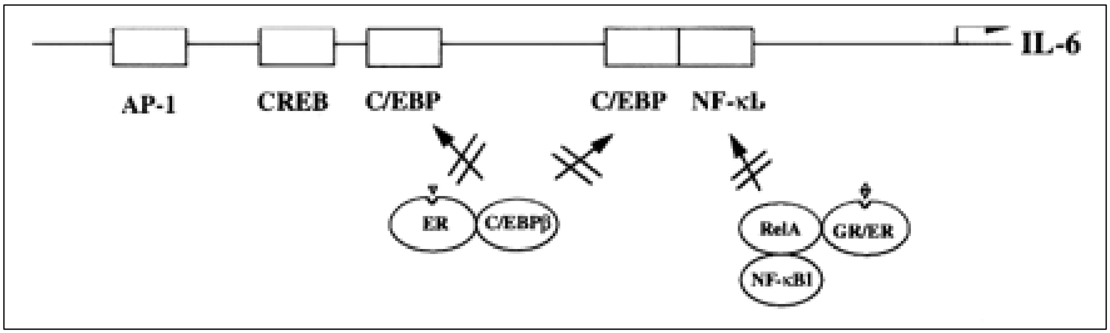
IL-6 και τροποποίηση του πόνου: Έχει βρεθεί ότι η IL-6 τροποποιεί την αίσθηση του πόνου σε αρουραίους. Για παράδειγμα, η ενδοεγκεφαλική/ενδοκοιλιακή χορήγηση IL-6 αυξάνει την αντίδραση στα επώδυνα ερεθίσματα μέσω ενός μηχανισμού που ενεργοποιεί τη σύνθεση των προσταγλανδινών [508].

Πίνακας: Βιολογική δράση της IL-6 στο ΚΝΣ

Βιολογική δράση
Επαγωγή της νευρωνικής επιβίωσης
Προστασία ενάντια στη νευρωνική βλάβη
Επαγωγή της νευρωνικής διαφοροποίησης
Αλληλεπίδραση με νευρωνικά συστήματα μεταφοράς Ca^{2+}
Τροποποίηση της βιοσύνθεσης των νευροδιαβιβαστών
Ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των αστροκυττάρων
Ενεργοποίηση του HPA άξονα και επαγωγή του πυρετού
Τροποποίηση του πόνου

Το γονίδιο της IL-6

Το ανθρώπινο γονίδιο της IL-6 έχει χαρτογραφηθεί στον βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7, στην περιοχή p21-p15. Αποτελείται από 5 εξόνια και 4 ιντρόνια, και έχει μια περίπλοκη μεταγραφική ρύθμιση [509]. Πιο συγκεκριμένα, ο υποκινητής του γονιδίου της IL-6 έχει θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα NF-IL6 (C/EBP β), που ανήκει στην C/ EBP οικογένεια, και τον NF-κB, που ρυθμίζει τη φλεγμονώδη αντίδραση [510, 511].



Εικόνα 1: Μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της IL-6. Τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν τη μεταγραφή της IL-6, μέσω αλληλεπίδρασης του GR υποδοχέα (glucocorticoid receptor) με την Re1A υπομονάδα του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα. Επίσης, τα οιστρογόνα αναστέλλουν τη μεταγραφή της IL-6, μέσω σχηματισμού ER (estrogen receptor)/C/EBPbeta και ER/NF-κB συμπλόκων. AP-1:AP-1 site, CREB:cyclic adenosine 5'-monophosphate-response element binding site, C/EBP:C/EBP binding site, NF-κB:NF-κB binding site. Το τρίγωνο αναπαριστά τα γλυκοκορτικοειδή και ο ρόμβος τα οιστρογόνα.

Το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα της IL-6 (IL-6R) έχει χαρτογραφηθεί στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 1, στην περιοχή q21-q22.

Πολυμορφισμός στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της IL-6

Υπάρχει ένας πολυμορφισμός απλού νουκλεοτιδίου (SNP) που παρατηρείται στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της IL-6, στη θέση -174 [512]. Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται να ρυθμίζει τα επίπεδα της IL-6 στο πλάσμα in vivo [369, 513] και το ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου της IL-6 [514]. Έχουν περιγραφεί 2 αλλήλια: αλλήλιο C (παρουσία κυτοσίνης), αλλήλιο G (παρουσία γουανίνης). Έχει βρεθεί ότι ο CC γονότυπος σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα IL-6 στο πλάσμα φυσιολογικών ατόμων, ενώ ο GG γονότυπος επάγει την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων IL-6 στο ανθρώπινο πλάσμα [515, 516]. Ωστόσο, σε μια μελέτη βρέθηκε ότι το C αλλήλιο δεν επηρέαζε τα επίπεδα της IL-6 [517], ενώ σε άλλη μελέτη ανιχνεύτηκαν υψηλά επίπεδα IL-6 ανάμεσα στους CC φορείς [518].

Η συχνότητα των αλληλίων διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών. Πιο συγκεκριμένα, σε μη-Καυκάσιους πληθυσμούς, η συχνότητα του G αλληλίου κυμαίνεται μεταξύ του 0.87-1.0, ενώ σε Καυκάσιους πληθυσμούς αυτή μειώνεται στο 0.54-0.62 [519-521]. Επίσης, η συχνότητα του GG γονοτύπου είναι γενικά υψηλότερη στους μη-Καυκάσιους πληθυσμούς (ποσοστό 80-100%), σε σύγκριση με την αντίστοιχη σε Καυκάσιους πληθυσμούς (ποσοστό 30-45%). Τέλος, σε μια μελέτη σε φυσιολογικό πληθυσμό Βρετανών διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα του GG γονοτύπου ήταν υψηλότερη (ποσοστό 38%), σε σύγκριση με την αντίστοιχη του CC γονοτύπου (ποσοστό 18%) [512].

Συσχέτιση του πολυμορφισμού της IL-6 με άλλες νόσους

Έχει βρεθεί ότι ο πολυμορφισμός στον υποκινητή του γονιδίου της IL-6 επηρεάζει τη συχνότητα και/ή τη σοβαρότητα διάφορων νοσημάτων. Αυτό πιθανό να οφείλεται σε αλλαγές στην έκφραση της IL-6, ανάλογα με τον γονότυπο του κάθε ασθενούς.

IL6-174G αλλήλιο

- ✓ με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 [522]
- ✓ με σοβαρό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και την κλινική έκβαση σε ασθενείς με οξύ ισχαιμικό ΑΕΕ [523]
- ✓ με ασυμπτωματική αθηροσκλήρυνση της καρωτίδας [524]
- ✓ με τη διάρκεια νοσηλείας μετά από αγγειοπλαστική των στεφανιαίων αγγείων [525]
- ✓ με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης σηψαιμίας σε πρόωρα νεογνά [295]
- ✓ με υψηλά επίπεδα λιπιδίων του πλάσματος, με συνέπεια υψηλό κίνδυνο εμφάνισης λιπιδικών ανωμαλιών [526]
- ✓ με τη σοβαρότητα και τη μη-ευνοϊκή έκβαση ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών [527]
- ✓ με αυξημένη προδιάθεση για εμφάνιση σαρκώματος Kaposi μετά από μόλυνση με τον HIV ιό (Human Immunodeficiency Virus) [528] και υψηλό κίνδυνο εκδήλωσης λεμφώματος Hodgkin σε νεαρούς ενήλικες [529]

IL6-174C αλλήλιο

- ✓ πιθανό να σχετίζεται με χρόνια νεανική αρθρίτιδα [512]
- ✓ με υψηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας/ή σοβαρότητας καρδιαγγειακού νοσήματος μετά από ανευρύσματα κοιλιακής αορτής [530]
- ✓ με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέως εντέρου [531]

Πίνακας: Μερικές από τις συσχετίσεις του πολυμορφισμού IL-6 (-174G/C)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ

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.

Η γενετική ποικιλομορφία στις διάφορες γονιδιακές θέσεις μπορεί να προκύψει από ενθέσεις (insertions), ελλείψεις (deletions), διπλασιασμούς (duplications), ή πολυμορφισμούς απλού νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs) που είναι και οι πιο συχνοί. Οι πολυμορφισμοί συναντώνται κατά μήκος ολόκληρου του γενώματος και είναι πιθανόν να συμβαίνουν και κοντά στις κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να επηρεάσουν τον κλινικό φαινότυπο, είτε επιδρώντας στη λειτουργία της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης, είτε μεταβάλλοντας τη δομή της ή τροποποιώντας την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου.

Οι μελέτες συσχέτισης εξετάζουν τη συχνότητα με την οποία τα αλληλόμορφα που προκύπτουν από τους πολυμορφισμούς συναντώνται στους φορείς του υπό εξέταση νοσήματος σε σύγκριση με τη φυσιολογική ομάδα ελέγχου. Η αυξημένη συχνότητα ενός αλληλομόρφου σ’ έναν φαινότυπο (για παράδειγμα η ευνοϊκή έκβαση στην περίπτωση των ασθενών με ΚΕΚ) σε σύγκριση με έναν διαφορετικό φαινότυπο (μη ευνοϊκή έκβαση) αποτελεί ισχυρή ένδειξη γενετικής συσχέτισης. Ωστόσο, η γενετική συσχέτιση δεν σημαίνει απαραίτητα και την ταυτοποίηση του υπεύθυνου για την πάθηση γονιδίου. Η γενετική συσχέτιση που προέκυψε μπορεί για παράδειγμα να είναι αποτέλεσμα συστηματικού σφάλματος διαστρωμάτωσης (stratification bias) του δείγματος, ή ανισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium) με τον πραγματικά υπεύθυνο για το φαινότυπο πολυμορφισμό ή άλλων εγγενών περιορισμών των μελετών συσχέτισης.

Για τη διενέργεια μιας μελέτης γενετικής συσχέτισης απαιτείται το γονίδιο, από το οποίο θα επιλέξουμε κάποιο πολυμορφισμό για μελέτη, να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της νόσου, να υπάρχει με άλλα λόγια βιολογική σημαντικότητα και αιτιότητα.

Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για κάποιο φαινότυπο πολυπαραγοντικών νοσημάτων αναμένεται να προκαλούν ελάχιστη ή μέτρια αύξηση του κινδύνου εμφάνισης του συγκεκριμένου φαινοτύπου της νόσου, δηλαδή αναμένεται ένας λόγος πιθανοτήτων (odds ratio) από 1.2 έως 1.4. Επιπλέον, η λειτουργία ενός γονιδίου μπορεί να τροποποιηθεί από άλλα γονίδια (αλληλεπιδράσεις του γονιδίου με άλλα γονίδια), από πρωτεΐνες (αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με άλλες πρωτεΐνες), ή από περιβαλλοντικούς παράγοντες (αλληλεπιδράσεις γονιδίου-περιβάλλοντος), καθιστώντας έτσι την ανίχνευση των επιδράσεών του πολύ δύσκολη. Η συμφωνία στα αποτελέσματα μεταξύ των διάφορων μελετών που πραγματοποιούνται σε ανεξάρτητους πληθυσμούς ενισχύει την άποψη ότι ο μελετούμενος πολυμορφισμός αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τον συγκεκριμένο φαινότυπο.

Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης και ιδίως όταν πραγματοποιούνται σε μικρά σε μέγεθος δείγματα μπορεί να στερούνται στατιστικής ισχύος για την ανίχνευση μιας σημαντικής συσχέτισης. Για παράδειγμα, για να επιτευχθεί ένα ποσοστό 80% της στατιστικής ισχύος για την ταυτοποίηση μιας μέτριας γενετικής επίδρασης (OR=1.2) ενός πολυμορφισμού που εμφανίζεται στο 10% των ατόμων, απαιτείται ένα δείγμα μεγέθους τουλάχιστον 10.000 ασθενών. Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι τα μεγέθη των δειγμάτων που απαιτούνται για την ανίχνευση γενετικών συσχετίσεων δεν είναι συχνά διαθέσιμα από ένα μεμονωμένο νοσηλευτικό ίδρυμα. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για να υπερκεράσουν αυτό το πρόβλημα, όπως η διενέργεια πολυκεντρικών μελετών ή οι μετα-αναλύσεις πολλών μελετών σε μικρά δείγματα. Μια άλλη προσέγγιση που αυξάνει τη στατιστική ισχύ των γενετικών μελετών συσχέτισης είναι η εφαρμογή της ανάλυσης των απλοτύπων. Η μέθοδος αυτή υποδιαιρεί τη μελετώμενη ομάδα σε πιο γενετικά διακριτές υποκατηγορίες. Επιπλέον, η στατιστική ισχύς μιας μελέτης γενετικής συσχέτισης μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση σαφώς καθορισμένων ενδιάμεσων φαινοτύπων, οι οποίοι είναι πιθανό να βρίσκονται πιο κοντά στην παθοφυσιολογία ενός νοσήματος από ένα γενικότερο φαινότυπο που είναι πιο σύνθετος και πολυπαραγοντικός ως προς την αιτιοπαθογένειά του. Ενδιάμεσοι φαινότυποι που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες γενετικής συσχέτισης σε ασθενείς με ΚΕΚ είναι οι εναποθέσεις Αβ πεπτιδίου [225], το μέγεθος του εγκεφαλικού αιματώματος [229], ή η παρουσία εγκεφαλικής αιμορραγίας [322].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η έκβαση μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση παρουσιάζει σημαντική ποικιλομορφία, η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί πλήρως με τους μέχρι τώρα γνωστούς παράγοντες κινδύνου. Όλο και περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν διάφορους γενετικούς παράγοντες να εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ. Η έκταση της βλάβης του εγκεφάλου μετά από ΚΕΚ φαίνεται ότι επηρεάζεται σε κάποιο βαθμό από γενετικούς πολυμορφισμούς.

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στην υπόθεση ότι οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων των ιντερλευκινών, λόγω της επίδρασής τους στην ένταση της φλεγμονώδους αντίδρασης, μπορούν να επηρεάσουν το βαθμό της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ και κατά συνέπεια την κλινική εικόνα και την έκβαση των ασθενών.

Σκοπός της παρούσας προοπτικής μελέτης σε ασθενείς με ΚΕΚ είναι η διερεύνηση της επίδρασης των πολυμορφισμών της IL-1β(-511C/T: **rs16944**), IL-1β(+3953C/T: **rs1143634**), IL-1α(-889C/T: **rs1800587**), IL-1RA (VNTR στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου: **rs2234663**), IL-2(+114G/T: **rs2069763**), IL-2(-384T/G: **rs2069762**) και της IL-6(-174G/C: **rs1800795**) σε διάφορες κλινικές (τη βαρύτητα κατά την εισαγωγή, την εξάμηνη έκβαση) και απεικονιστικές παραμέτρους (εγκεφαλική αιμορραγική βλάβη, όγκος του αιματώματος) των ασθενών.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Από την έναρξη της μελέτης έχει γίνει προοπτική συλλογή 365 ασθενών με ΚΕΚ, οι οποίοι προσήλθαν στο τμήμα επειγόντων περιστατικών του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας.

Η καταγραφή των ασθενών αυτών περιελάμβανε:

1. Πλήρη καταγραφή των δημογραφικών και κλινικών στοιχείων των ασθενών, όπως ηλικία, φύλο, ύπαρξη αγγειακών παραγόντων κινδύνου (αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, στεφανιαία νόσος, υπερλιπιδαιμία, κάπνισμα, αλκοόλ). 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%. Υπερχολιστερολαιμία 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 εκτίμηση της αρχικής κλινικής εικόνας του ασθενούς με τη χρήση της κλίμακας κώματος της Γλασκόβης (Glasgow Coma Scale: GCS). Η GCS 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

3. Πλήρη αιματολογικό έλεγχο και βιοχημικό έλεγχο του ασθενούς.

4. Καταγραφή των ευρημάτων της αξονικής ή της μαγνητικής τομογραφίας, όπως η ύπαρξη ή όχι αιμορραγικών θλάσεων, αιμορραγικής ή οιδηματώδους αξονότμησης, υπαραχνοειδούς αιμορραγίας, υποσκληρίδιου ή επισκληρίδιου αιματώματος, ενδοεγκεφαλικής ή ενδοκοιλιακής αιμορραγίας, διάχυτου εγκεφαλικού οιδήματος και παρεκτόπισης της μέσης γραμμής. Στους ασθενείς με εγκεφαλικό αιμάτωμα (υποσκληρίδιο, επισκληρίδιο, ενδοεγκεφαλικό) έγινε υπολογισμός του όγκου του αιματώματος με βάση τον τύπο ABC/2.

5. Καταγραφή του χρόνου παραμονής ή όχι των ασθενών στη μονάδα εντατικής θεραπείας και του μηχανικού αερισμού.

6. Αιμοληψία και απομόνωση γενωμικού DNA από πυρήνες λευκοκυττάρων (μετά από έγγραφη συγκατάθεσή τους) με τη μέθοδο της εξαλάτωσης και προσθήκη πρωτεΐνάσης K και στη συνέχεια έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του DNA με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

7. Επανεκτίμηση των ασθενών 6 μήνες μετά την ΚΕΚ και καταγραφή της έκβασής τους και της λειτουργικής αποκατάστασής τους με βάση την κλίμακα έκβασης της Γλασκόβης (Glasgow Outcome Scale: GOS). Για καλύτερη στατιστική ανάλυση δημιουργήθηκαν δύο κατηγορίες ασθενών: ευνοϊκής έκβασης (GOS= ασθενείς με πλήρη ανάρρωση (G) ή μέτρια ανικανότητα (MD)), στην οποία ανήκαν οι ασθενείς που ήταν λειτουργικά ανεξάρτητοι μετά το συμβάν και η κατηγορία της μη ευνοϊκής έκβασης (GOS= ασθενείς με σοβαρή ανικανότητα (SD) ή σε φυτική κατάσταση (V) ή αυτοί που κατέληξαν (D)).

Ανάλυση των πολυμορφισμών

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από περιφερικό αίμα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της εξαλάτωσης [532]. Ακολούθησε έλεγχος της ποιότητας και της συγκέντρωσης του DNA.

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 [533] 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-1β. 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-1β(+3953)

Ενισχύθηκε η περιοχή που περιέχει τον πολυμορφισμό στο 5^0 εξόνιο του γονιδίου της IL-1β. Το προϊόν της PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1.5%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο Taq I και τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης (2%) 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-1α. 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 της IL-2(-384)

Ενισχύθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) η περιοχή που περιέχει τον πολυμορφισμό στη θέση –384 του υποκινητή του γονιδίου της IL-2. Το προϊόν της PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (3.5%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο Bfa I και τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης (3.5%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV.

Ανάλυση του πολυμορφισμού της IL-2(+114)

Ενισχύθηκε η περιοχή που περιέχει τον πολυμορφισμό εντός του πρώτου εξονίου του γονιδίου της IL-2 στη θέση +114. Το προϊόν της PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο Mwo I και τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης (3%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV.

Ανάλυση του πολυμορφισμού της IL-6(-174)

Ενζυμική ενίσχυση του DNA πραγματοποιήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και πιο ειδικά ενισχύθηκε η περιοχή που περιέχει τον πολυμορφισμό στη θέση –174 του υποκινητή του γονιδίου της IL-6. Το προϊόν της PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγινε ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη του PCR προϊόντος με το περιοριστικό ένζυμο SfaN I και τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης (3%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV.

Στατιστική ανάλυση

Η ισορροπία Hardy-Weinberg (H-W) εξετάσθηκε με τη χρήση του Fisher exact test στο ειδικό online λογισμικό πρόγραμμα (Institute of Human Genetics, Technical University Munich, Munich, Germany, http://ihg.gsf.de/cgibin/hw/hwa1.pl). Η ανάλυση ισχύος της μελέτης (power analysis) έγινε με τη χρήση του προγράμματος CaTS (CaTS Power Calculator for Genetic Studies (Center for Statistical Genetics, University of Michigan, Ann Arbor, MI http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/cats/).

Οι πιθανές συσχετίσεις των διαφόρων αλληλομόρφων ή των γονοτύπων μεταξύ των ασθενών με ευνοϊκή ή δυσμενή έκβαση μετά από ΚΕΚ εξετάσθηκαν με τη χρήση του χ^2 τεστ. Παρόμοια ελέγχθηκαν οι διάφορες υποκατηγορίες των ασθενών με ΚΕΚ (σύγκριση ομάδας ασθενών με GCS εισόδου 3-8 σε σχέση με αυτούς που είχαν 9-12 ή 13-15, σύγκριση ομάδας ασθενών με αιμορραγικά ή μη φαινόμενα).

Επιπλέον, για να γίνει προσαρμογή της γενετικής συσχέτισης κάθε πολυμορφισμού, λαμβάνοντας υπόψη τις επιδράσεις διαφόρων συγχυτικών παραγόντων, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση με λογιστική παλινδρόμηση (logistic regression), με βάση την οποία υπολογίσθηκε ο λόγος αναλογιών (odds ratio) με τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% confidence intervals). Έτσι, για τον έλεγχο μεταξύ καλής και δυσμενούς έκβασης έγινε σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα, GCS εισόδου και νευροχειρουργική (Ν/Χ) επέμβαση. Για τη διερεύνηση συσχέτισης ανάμεσα στις διάφορες υποκατηγορίες της GCS (3-8, 9-12, 13-15) έγινε σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα. Τέλος, για τη σύγκριση ανάμεσα στα άτομα με αιμορραγικά ή όχι φαινόμενα έγινε σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα, GCS εισόδου και Ν/Χ επέμβαση.

Για τη μελέτη των πολυμορφισμών εξετάσθηκε η επίδραση των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων εφαρμόζοντας επικρατητικό ή υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης και το μοντέλο της σύγκρισης-αντίθεσης των αλληλομόρφων (allele contrast). Επίσης, εξετάσθηκε αν η επίδραση των αλληλομόρφων έχει σχέση με τον αριθμό τους, δηλαδή αν υπάρχει δοσοεξαρτώμενο αποτέλεσμα (προσθετικό μοντέλο).

Έγινε κατασκευή απλοτύπων σε SNPs που ανήκουν στο ίδιο χρωμόσωμα. Έτσι, κατασκευάστηκαν απλότυποι για τους πολυμορφισμούς της οικογένειας της IL-1 [IL-1α -889C/T (rs1800587), IL-1β +3953C/T (rs1143634), IL-1β -511C/T (rs16944), IL-1RA VNTR (rs2234663)] που εδράζονται στο χρωμόσωμα 2 και για τους πολυμορφισμούς της IL-2 [IL-2 +114G/T (rs2069763), IL-2 -384T/G (rs2069762)] που εδράζονται στο χρωμόσωμα 4. Ο πολυμορφισμός 174G/C (rs1800795) της IL-6 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7, οπότε δε συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση.

Για την κατασκευή των απλοτύπων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκτίμησης της μεγίστης πιθανοφάνειας (maximum-likelihood estimation). Η σύγκριση των απλοτύπων έγινε με το πρόγραμμα shesis (http://analysis.bio-x.cn/SHEsisMain.htm), το οποίο εκτελεί permutation tests για εύρεση σφαιρικής συσχέτισης, καθώς και σύγκριση των απλοτύπων χωριστά για εύρεση της σημαντικότητας συγκεκριμένων απλοτύπων, χρησιμοποιώντας το Freeman-Tukey και proportion tests.

Έγινε υπολογισμός της ανισορροπίας σύνδεσης (κατά ζεύγη D΄και r^2) μεταξύ των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος JLIN (http://www.genepi.com.au/projects/jlin).

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις εκτελέστηκαν χρησιμοποιώντας τα στατιστικά πακέτα SPSS v.12.0 (Chicago, IL) και SAS v.6.12 (Cary, NC). Για τον υπολογισμό της στατιστικής σημαντικότητας εφαρμόστηκε η διόρθωση κατά Bonferroni http://www.quantitativeskills.com/sisa/calculations/bonfer.htm, λόγω της διενέργειας πολλαπλών συσχετίσεων.

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 εμπύρηνα 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:

–Διαλύματα 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 Κ (10mg/ml)

–Διάλυμα 10% w/v SDS (sodium dodecyl sulfate: δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο)

–Κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M)

–Απόλυτη αιθανόλη

–CH_3COONa (3M)

–Πηκτή αγαρόζης 1%

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 έως 12ml με ddH_2O (δις απεσταγμένο νερό). Ακολουθεί καλή ανάδευση (με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων).
2. Φυγοκεντρούμε για 15min, στις 3500rpm, στους 4^0C (απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων).
3. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία συνεχίζεται με το ίζημα. Τα κύτταρα αραιώνονται με ddH_2O έως 12ml και ανακινούμε σε vortex.
4. Φυγοκεντρούμε για 15min, στις 3500rpm, στους 4^0C.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα lysis I μέχρι τα 12ml.
6. Φυγοκεντρούμε για 15min, στις 3500rpm, στους 4^0C.
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 (Ca^{2+}, Mg^{2+}) 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 πρωτεϊνάσης 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 πρωτεϊνάση K επιτυγχάνεται η διάσπαση και η πέψη των πρωτεϊνών, με τις οποίες είναι συνδεδεμένο το DNA).
10. Επώαση στους 37^0C για 16-18hrs (overnight-O/N).

2η μέρα

1. Προσθέτουμε 2ml 6M κεκορεσμένου διαλύματος NaCl. Αναδεύουμε ισχυρά για 15sec (με τη διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα η κατακρήμνιση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών).
2. Φυγοκεντρούμε για 15min, στις 3500rpm, στους 4^0C.

3. Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο και απορρίπτουμε το ίζημα. Αναδεύουμε ισχυρά.
4. Φυγοκεντρούμε για 15min, στις 3500rpm, στους 4^0C.
5. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο των 50ml και απορρίπτουμε το ίζημα.
6. Ακολουθεί καταβύθιση του νουκλεϊκού οξέος, που βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα, με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης (2πλάσιο όγκο σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και CH_3COONa 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 CH_3COONa
7. Επώαση στους -20^0C O/N.

3η μέρα

1. Φυγοκεντρούμε για 50min, στις 3500rpm, στους 4^0C.
2. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Το DNA που συλλέγεται «ξεπλένεται» με διάλυμα αιθανόλης 70% και εισάγεται σε σωληνάριο τύπου eppendorf (το συγκεκριμένο βήμα καθαρισμού χρειάζεται για την απομάκρυνση του άλατος που έχει παραμείνει στο διάλυμα).
3. Φυγοκεντρούμε για 30min, στις 12000rpm, στους 4^0C.
4. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 2 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρησης 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 4^0C (για συχνή χρήση) ή στους -20^0C (για μεγάλο χρονικό διάστημα).

Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA

Α. 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.

Β. 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:

$$\boxed{\text{Συγκέντρωση DNA (μg/ml)} = \text{αραίωση} \times 50 \times \text{τιμή } OD_{260}}$$

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 eppendorf με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή.

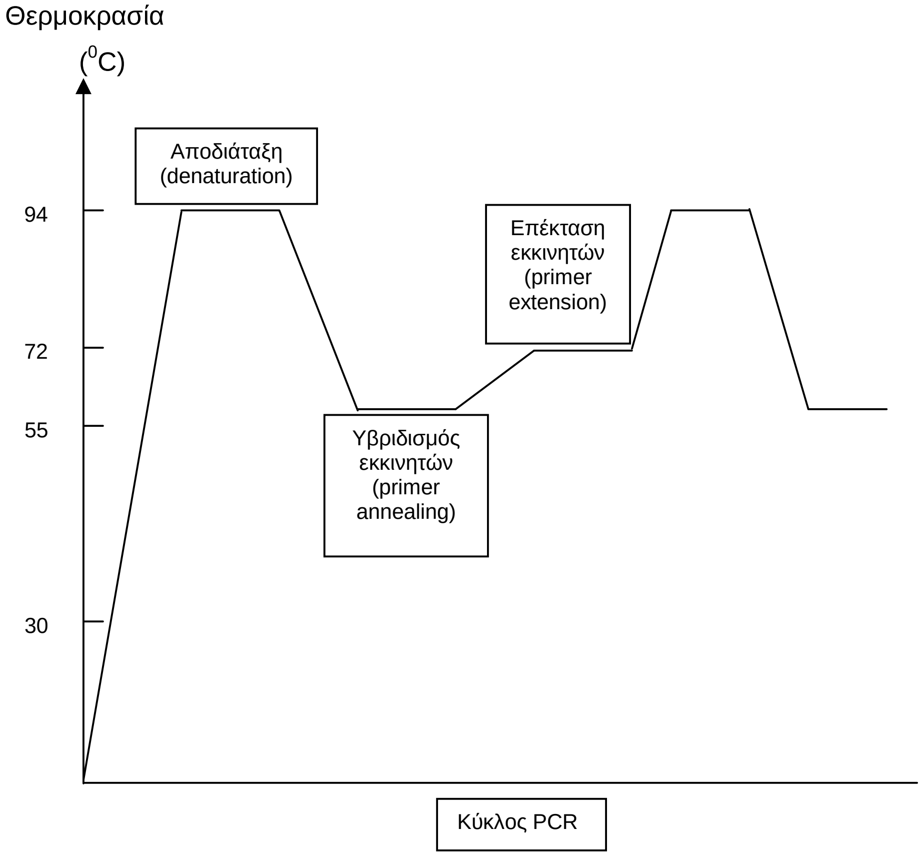
1ο στάδιο: θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (denaturation)

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

3ο στάδιο: σύνθεση DNA, όπου παρουσία Taq 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 θερμοκρασιακής εναλλαγής κατά τη διάρκεια ενός κύκλου PCR:



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^{0}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^{0}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^{0}C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m) των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων. Θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 55 με 65^{0}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 72^{0}C. 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 $MgCl_2$
- ➢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 0.1-0.2μΜ. 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:

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

Επιθυμητές T_m κυμαίνονται μεταξύ 55-65^{0}C.

Η Taq DNA-πολυμεράση που απομονώνεται από το θερμόφιλο 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^{0}C.

Επιπλέον, ελεύθερα 5΄τριφωσφορικά δεοξυριβοζονουκλεοτίδια (dNTPs) απαιτούνται για τη σύνθεση του DNA. Τα τέσσερα dNTPs (dATP, dTTP, dCTP και dGTP) ενδείκνυνται 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 20-200μΜ 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 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:

<u>PCR συνθήκες</u>:
95^{0}C για 7min
95^{0}C για 30sec
56^{0}C για 30sec 32 κύκλοι
72^{0}C για 90sec
72^{0}C για 7min
4^{0}C για ∞

	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	0.05u
ddH$_2$O	17.75μl	-
Τελικός όγκος (V$_{ΤΕΛ.}$)	25.00μl	

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

Το τμήμα του **<u>γονιδίου της IL-1β</u>** 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:

<u>PCR συνθήκες</u>:
95^{0}C για 3min
95^{0}C για 1min
55^{0}C για 1min 35 κύκλοι
74^{0}C για 1min
74^{0}C για 6min
4^{0}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$_{ΤΕΛ.}$)	50.00μl	

Το τμήμα του **γονιδίου της IL-1β** στη θέση +3953 εντός του πρώτου εξονίου (+3953C/T) που περιέχει τον πολυμορφισμό ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές:

Primer F: $^{5'}$**GCC ACA GTG AGC AGT AAT AGA**^{3}
Primer R: $^{5'}$**CAA CAA CAG GAA GAG AGA ACC**$^{3'}$

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

PCR συνθήκες:
95^{0}C για 7min
$$\left.\begin{array}{l}95^0\text{C για 30sec}\\ 55^0\text{C για 30sec}\\ 72^0\text{C για 90sec}\end{array}\right\}\text{ 32 κύκλοι}$$
72^{0}C για 7min
4^{0}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_2O	34.00μl	-
Τελικός όγκος ($V_{ΤΕΛ.}$)	50.00μl	

Το τμήμα του **<u>γονιδίου της IL-1α</u>** 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:

<u>PCR συνθήκες</u>:
94^0C για 7min
94^0C για 1min
50^0C για 1min 35 κύκλοι
72^0C για 1min
72^0C για 10min
4^0C 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_2O	35.00μl	-
Τελικός όγκος ($V_{ΤΕΛ.}$)	50.00μl	

Το τμήμα του **γονιδίου της IL-2** στη θέση –384 του υποκινητή (-384T/G) που περιέχει τον πολυμορφισμό ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές:

Primer F: $^{5'}$**CTC TTT GTT ACA TTA GCC CAC ACT TAG GTG**$^{3'}$
Primer R: $^{5'}$**CAC AAT ATG CTA TTC ACA TGT TCA GTG TAG**$^{3'}$

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

PCR συνθήκες:
94^0C για 2min
94^0C για 20sec
66^0C για 40sec — 35 κύκλοι
72^0C για 20sec
72^0C για 10min
4^0C 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)	3.00μl	3mM
Taq DNA Polymerase (5u/μl)	0.50μl	0.05u
ddH_2O	33.00μl	-
Τελικός όγκος ($V_{\text{ΤΕΛ.}}$)	50.00μl	

Το τμήμα του **<u>γονιδίου της IL-2</u>** στη θέση +114 εντός του πρώτου εξονίου (+114G/T) που περιέχει τον πολυμορφισμό ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές:

Primer F: $^{5'}$**ATG TAC AGG ATG CAA CTC CT**$^{3'}$
Primer R: $^{5'}$**TGG TGA GTT TGG GAT TCT TG**$^{3'}$

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

PCR συνθήκες:
94^{0}C για 2min
94^{0}C για 20sec
52^{0}C για 40sec } 35 κύκλοι
72^{0}C για 20sec
72^{0}C για 10min
4^{0}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)	3.00μl	3mM
Taq DNA Polymerase (5u/μl)	0.50μl	0.05u
ddH_2O	33.00μl	-
Τελικός όγκος ($V_{ΤΕΛ.}$)	50.00μl	

Το τμήμα του **<u>γονιδίου της IL-6</u>** στη θέση –174 του υποκινητή (-174G/C) που περιέχει τον πολυμορφισμό ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους εκκινητές:

Primer F: $^{5'}$**CAG AAG AAC TCA GAT GAC TGG**$^{3'}$
Primer R: $^{5'}$**GCT GGG CTC CTG GAG GGG**$^{3'}$

Οι συνθήκες της PCR περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

<u>PCR συνθήκες</u>:
95^0C για 5min
95^0C για 1min
63^0C για 1min } 30 κύκλοι
72^0C για 2min
72^0C για 10min
4^0C 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)	0.50μl	0.2μM
Primer R (10μM)	0.50μl	0.2μM
$MgCl_2$ (50mM)	0.75μl	1.5mM
Taq DNA Polymerase (5u/μl)	0.50μl	0.1u
ddH_2O	17.25μl	-
Τελικός όγκος ($V_{ΤΕΛ.}$)	25.00μl	

Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση ορίζεται ως η μετακίνηση ενός φορτισμένου μορίου υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Περιγράφεται από τον τύπο: $\boxed{v=E\times z/f}$. 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 αγαρόζης 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 αγαρόζη, 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 αγαρόζη τόσο αυξάνεται και η ικανότητά της να διαχωρίζει μικρού μεγέθους μόρια. Οι πηκτές αγαρόζης ηλεκτροφορούνται συνήθως οριζόντια σε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής ισχύος και κατεύθυνσης.

Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάζεται λιώνοντας την αγαρόζη 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 αγαρόζης, (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 αγαρόζης. 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.

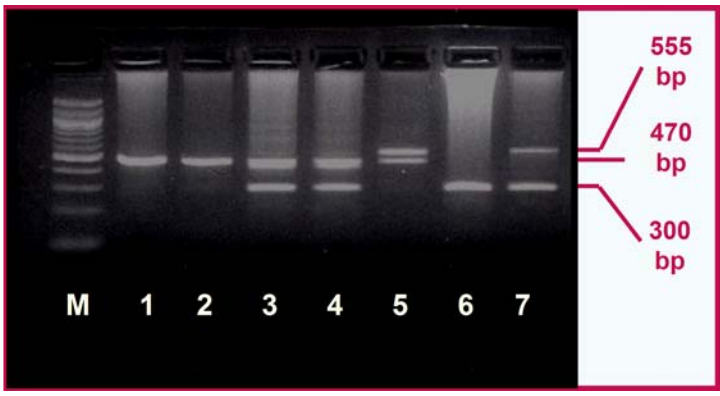
Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA σε πηκτή αγαρόζης δεν είναι δυνατόν να γίνουν ορατές εκτός αν το DNA βαφεί με κάποιο τρόπο. Για το λόγο αυτό ακολουθεί εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Η ουσία αυτή παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Μετά την τοποθέτηση της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

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 πέντε 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



Διαχωρισμός των προϊόντων PCR της IL-1RA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%

M: marker (100bp ladder)
1 και 2: 1,1 γονότυπος
3 και 4: 1,2 γονότυποι
5: 1,3 γονότυπος
6: 2,2 γονότυπος
7: 2,3 γονότυπος

IL-1β(-511)

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (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 πηκτή αγαρόζης (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
Allele 2	μη διάσπαση του PCR προϊόντος	304bp

IL-1β(+3953)

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1.5%) 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 731bp. Επίσης, όπως θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω, τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

Allele C	διάσπαση του PCR προϊόντος σε 2 τμήματα	497 και 234bp
Allele T	μη διάσπαση του PCR προϊόντος	731bp

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 (φX174 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	99bp
Allele C	διάσπαση του PCR προϊόντος σε 2 τμήματα	83 και 16bp

IL-2(-384)

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (3.5%) 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 (Low molecular weight DNA ladder). Το προϊόν της PCR ήταν το αναμενόμενο, στα 169bp. Επίσης, όπως θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω, τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (3.5%) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

Allele 1	μη διάσπαση του PCR προϊόντος	169bp
Allele 2	διάσπαση του PCR προϊόντος σε 2 τμήματα	137 και 32bp

IL-2(+114)

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) 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 (Low molecular weight DNA ladder). Το προϊόν της PCR ήταν το αναμενόμενο, στα 262bp. Επίσης, όπως θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω, τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (3%) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

Allele G	μη διάσπαση του PCR προϊόντος	262bp
Allele T	διάσπαση του PCR προϊόντος σε 2 τμήματα	151 και 111bp

IL-6(-174)

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%) 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 611bp. Επίσης, όπως θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω, τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (3%) και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

Allele G	μη διάσπαση του PCR προϊόντος	611bp
Allele C	διάσπαση του PCR προϊόντος σε 2 τμήματα	367 και 244bp

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 ΙΙ 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:

5′G↓AATTC3′
3′CTTAA↑G5′

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

- <u>Τμήματα με ελεύθερα ή τυφλά άκρα</u> (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 :

Hae III
5′GG↓CC3′
3′CC↑GG5′

5′GG CC3′
3′CC GG5′

Μετά από μια τέτοιου τύπου τομή, δε μπορεί να γίνει αυτόματη ένωση των δύο τμημάτων που προκύπτουν, παρά μόνο μετά τη δράση του ενζύμου Τ4 λιγάση, η οποία σχηματίζει έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό ανάμεσα στην 5′-φωσφορυλ-ομάδα του ενός κομματιού και την 3′-υδροξυλ-ομάδα ενός άλλου κομματιού.

- <u>Τμήματα με συνεκτικά ή συμπληρωματικά άκρα</u>, 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:

Eco RI
5′G↓AATTC3′
3′CTTAA↑G5′

5′G AATTC3′
3′CTTAA G5′

Μετά από μια τέτοιου τύπου τομή, οι δύο μονόκλωνες συμπληρωματικές ομάδες μπορούν να συζευχθούν. Η θερμοκρασία σύζευξης ενός τετρανουκλεοτιδίου κυμαίνεται στους 12 με 15^{0}C.

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:

Ava I
5′C↓(C ή T)CG(A ή G)G3′
3′G(G ή A)GC (T ή C)↑C5′
↙ ↘
5′C (C ή T)CG(A ή G)G3′
3′G(G ή A)GC(T ή C) C5′

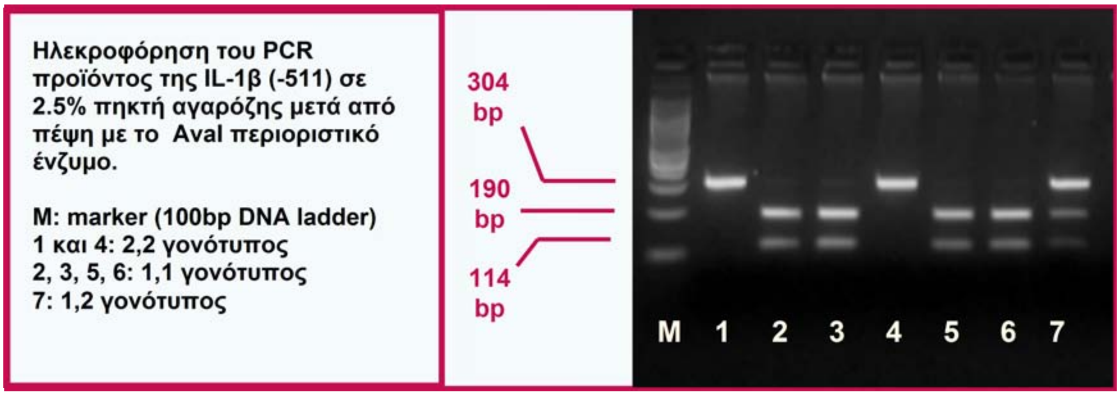
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος της PCR σε τελικό όγκο 40μl.

	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 ($V_{ΤΕΛ}$)	40.00 μl	

Μετά από επώαση για 16-18hrs (O/N) στους 37^{0}C, τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 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).


Ηλεκροφόρηση του PCR προϊόντος της IL-1β (-511) σε 2.5% πηκτή αγαρόζης μετά από πέψη με το AvaI περιοριστικό ένζυμο.

M: marker (100bp DNA ladder)
1 και 4: 2,2 γονότυπος
2, 3, 5, 6: 1,1 γονότυπος
7: 1,2 γονότυπος

IL-1β(+3953)

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Taq$^{\alpha}$ I.Το Taq$^{\alpha}$ I απομονώθηκε από ένα στέλεχος του βακτηρίου Escherichia Coli. Το ένζυμο αυτό περιέχει μια αντικατάσταση δύο αμινοξέων στο αμινο-τελικό άκρο του, η οποία επάγει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου και αναστέλλει τις καταλυτικές του ιδιότητες.

Η ενδονουκλεάση Taq$^{\alpha}$ I, που χρησιμοποιήθηκε, αναγνωρίζει και τέμνει ως εξής την παρακάτω αλληλουχία:

Taq$^{\alpha}$ I
5΄T↓CGA3΄
3΄AGC↑T5΄
↙ ↘
5΄T **CGA3΄**
3΄AGC **T5΄**

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

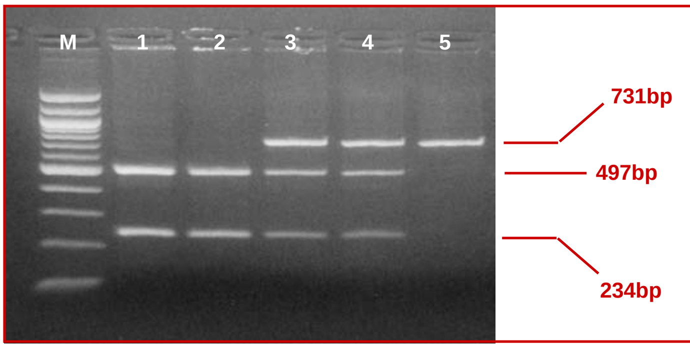
	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
PCR product	30.00 μl	
Ένζυμο Taq$^{\alpha}$ I (20u/μl)	1.00 μl	0.5u
10x NE Buffer 3	4.00 μl	1x
100x BSA*	0.40μl	1x
ddH$_2$O	4.60 μl	-
Τελικός όγκος ($V_{ΤΕΛ}$)	40.00 μl	

* Το <u>BSA</u> (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 65^{0}C, τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% 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:

- <u>IL1B+3953*C</u> (παρουσία κυτοσίνης-C στη θέση +3953 του 5^{ου} εξονίου του γονιδίου της IL-1B): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Taq$^{\alpha}$ I τέμνει το προϊόν της PCR σε ένα σημείο, οπότε προκύπτουν 2 τμήματα (497 και 234bp).
- <u>IL1B+3953*T</u> (παρουσία θυμίνης-T στη θέση +3953 του 5^{ου} εξονίου του γονιδίου της IL-1B): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Taq$^{\alpha}$ I δεν τέμνει το προϊόν της PCR (731bp).



Ηλεκτροφόρηση σε 2%πηκτή αγαρόζης του προϊόντος της PCR της IL-1β (+3953) μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Taq$^{\alpha}$ I.

M: 100bp DNA ladder
1 και 2: γονότυπος CC (497+234bp)
3 και 4: γονότυπος TC
5: γονότυπος TT (731bp)

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:

Nco I
5΄C↓CATGG3΄
3΄GGTAC↑C5΄

5΄C CATGG3΄
3΄GGTAC C5΄

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

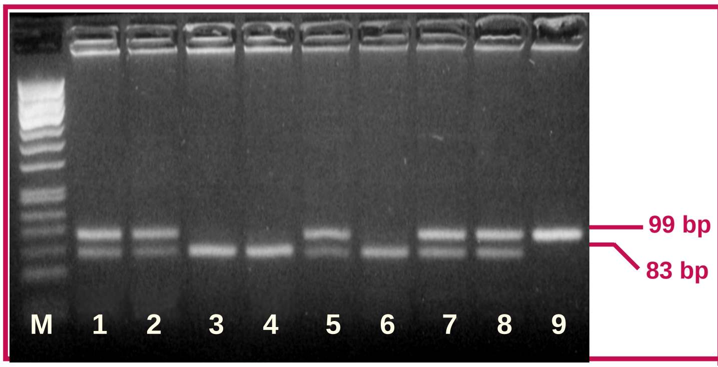
	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
PCR product	35.00 μl	
Ένζυμο Nco I (10u/μl)	1.50 μl	0.33u
10x NE Buffer 4	4.50 μl	1x
ddH$_2$O	4.00 μl	-
Τελικός όγκος (V$_{ΤΕΛ}$)	45.00 μl	

Μετά από επώαση για 16-18hrs (O/N) στους 37^{0}C, τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 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.



Ηλεκτροφόρηση σε 4% πηκτή αγαρόζης του προϊόντος PCR της IL-1a (-889) μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Nco I.

M: φX174 DNA/Hinf I
3, 4, 6: γονότυποι CC (83+16bp)
1, 2, 5, 7, 8: γονότυποι CT
9: γονότυπος TT (99bp)

IL-2(-384)

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Bfa I. Το Bfa I είναι το πρώτο ένζυμο που απομονώθηκε από το βακτήριο Bacteroides fragilis.

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

Bfa I
5´C↓TAG3´
3´GAT↑C5´

5´C TAG3´
3´GAT C5´

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

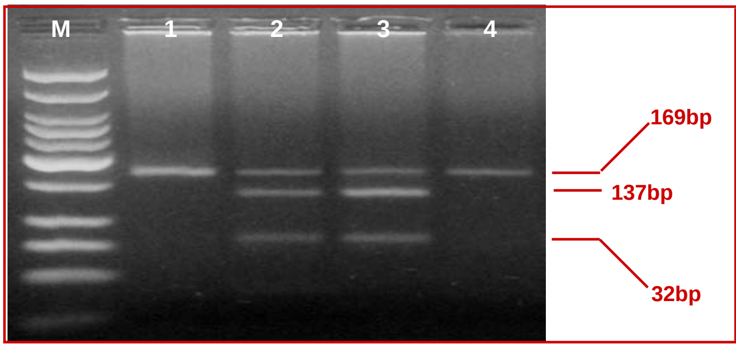
	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
PCR product	30.00 μl	
Ένζυμο Bfa I (5u/μl)	3.00 μl	0.38u
10x NE Buffer 4	4.00 μl	1x
ddH_2O	3.00 μl	-
Τελικός όγκος ($V_{ΤΕΛ}$)	40.00 μl	

Μετά από επώαση για 16-18hrs (O/N) στους 37^{0}C, τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3.5% 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 (Low molecular weight DNA ladder).

Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

- IL2-384*1 (παρουσία θυμίνης-Τ στη θέση -384 του υποκινητή του γονιδίου της IL-2): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Bfa I δεν τέμνει το προϊόν της PCR (169bp).
- IL2-384*2 (παρουσία γουανίνης-G στη θέση -384 του υποκινητή του γονιδίου της IL-2): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Bfa I τέμνει το προϊόν της PCR σε ένα σημείο, οπότε προκύπτουν 2 τμήματα (137 και 32bp).

Ωστόσο, κάποιες φορές το τμήμα των 32bp δεν είναι ορατό. Έτσι, και μόνο το τμήμα των 137bp υποδηλώνει την παρουσία του αλληλομόρφου IL2-384*2.



Ηλεκτροφόρηση σε 3.5% πηκτή αγαρόζης του προϊόντος της PCR της IL-2 (-384) μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Bfa I.

M: low molecular weight DNA ladder
1 και 4: γονότυποι 1,1
2 και 3: γονότυποι 1,2

IL-2(+114)

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

Mwo I
5΄GCNNNNN↓NNGC3΄
3΄CGNN↑NNNNNCG5΄
↙ ↘
5΄GCNNNNN **NNGC3΄**
3΄CGNN **NNNNNCG5΄**

* Όπου Ν: νουκλεοτίδιο

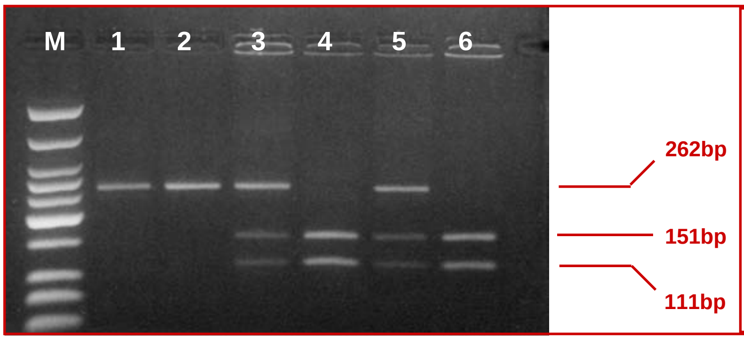
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος της PCR σε τελικό όγκο 40μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
PCR product	30.00 μl	
Ένζυμο Mwo I (5u/μl)	1.00 μl	0.13u
10x NE Buffer 3	4.00 μl	1x
ddH_2O	5.00 μl	-
Τελικός όγκος ($V_{ΤΕΛ}$)	40.00 μl	

Μετά από επώαση για 16-18hrs (O/N) στους 60^0C, τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 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 (Low molecular weight DNA ladder).

Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

- IL2+114*G (παρουσία γουανίνης-G στη θέση +114 του $1^{ου}$ εξονίου του γονιδίου της IL-2): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Mwo I τέμνει το προϊόν της PCR σε ένα σημείο, οπότε προκύπτουν 2 τμήματα (151 και 111bp).
- IL2+114*T (παρουσία θυμίνης-T στη θέση +114 του $1^{ου}$ εξονίου του γονιδίου της IL-2): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο Mwo I δεν τέμνει το προϊόν της PCR (262bp).



Ηλεκτροφόρηση σε 3% πηκτή αγαρόζης του προϊόντος PCR της IL-2 (+114) μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Mwo I.

M: low molecular weight DNA ladder
1, 2: γονότυπος TT (262bp)
3, 5: γονότυπος GT
4, 6: γονότυπος GG (151+111bp)

IL-6(-174)

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

SfaN I
5΄GCATC(N)$_5$↓3΄
3΄CGTAG(N)$_9$↑5΄
↓
5΄GCATC(N)$_5$
3΄CGTAG(N)$_9$

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος της PCR σε τελικό όγκο 25μl.

	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
PCR product	20.00 μl	
Ένζυμο SfaN I (1u/μl)	1.00 μl	0.04u
10x NE Buffer 3	2.50 μl	1x
ddH$_2$O	1.50 μl	-
Τελικός όγκος (V$_{ΤΕΛ}$)	25.00 μl	

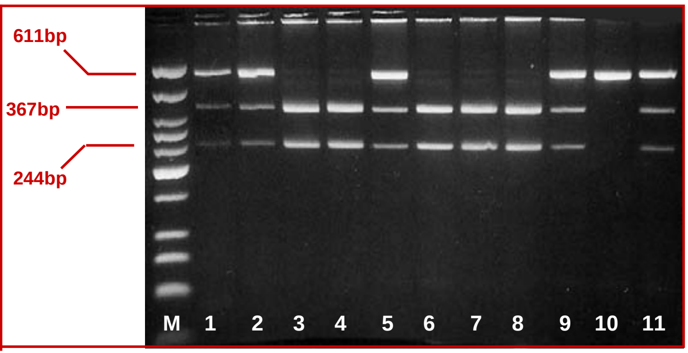
Μετά από επώαση για 16-18hrs (O/N) στους 37^{0}C, τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από την πέψη διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) με την εφαρμογή σταθερού ηλεκτρικού πεδίου 100V και έγιναν ορατά σε συσκευή UV. Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων της πέψης έγινε εφικτός μετά από σύγκριση με το μέγεθος των ζωνών γνωστού DNA (Low molecular weight DNA ladder).

Αναγνωρίστηκαν δύο αλληλόμορφα και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται παρακάτω:

- IL6-174*G (παρουσία γουανίνης-G στη θέση -174 του υποκινητή του γονιδίου της IL-6): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο SfaN I δεν τέμνει το προϊόν της PCR (611bp).
- IL6-174*C (παρουσία κυτοσίνης-C στη θέση -174 του υποκινητή του γονιδίου της IL-6): στην περίπτωση αυτή το περιοριστικό ένζυμο SfaN I τέμνει το προϊόν της PCR σε ένα σημείο, οπότε προκύπτουν 2 τμήματα (367 και 244bp).

Ηλεκτροφόρηση σε 3% πηκτή αγαρόζης του προϊόντος της PCR της IL-6 (-174) μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SfaN I.

M: low molecular weight DNA ladder
1,2,5,9,11: γονότυπος CG
3,4,6,7,8: γονότυπος CC (367+244bp)
10: γονότυπος GG (611bp)



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα κύρια κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΚΕΚ που συλλέχθηκαν φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί. Συνολικά συλλέχθηκαν 365 ασθενείς με ΚΕΚ, 305 άνδρες και 60 γυναίκες (αναλογία περίπου 5:1). Η μέση (mean) ηλικία των ασθενών ήταν 40.06±20,99 έτη και η οποία δε διέφερε σημαντικά ανάμεσα στα δύο φύλα. Στο πίνακα φαίνεται επίσης η συχνότητα διαφόρων επιδημιολογικών παραγόντων κινδύνου, οι οποίοι είναι περίπου όπως στο γενικό πληθυσμό [1].

Η βαρύτητα της κάκωσης καταγράφηκε κατά την είσοδο των ασθενών στο νοσοκομείο με βάση την κλίμακα Γλασκόβης εισόδου (GCS). Η μέση GCS των ασθενών του δείγματος ήταν 10.99±3.85. Με βάση τις υποκατηγορίες της GCS 34.24% των ασθενών είχε βαριά κλινική εικόνα (GCS≤8), 15,34% είχε κλίμακα κώματος Γλασκόβης 9-12 και 50.41% των ασθενών είχε καλή κλινική εικόνα κατά την είσοδο στο Νοσοκομείο (GCS 13-15).

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν επίσης ανάλογα με τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας και ειδικότερα κατά το πόσο υπήρχαν αιμορραγικά στοιχεία. Από το σύνολο των ασθενών, 78 ασθενείς (ποσοστό 21.37%) δεν είχαν κάποιο αιμορραγικό στοιχείο. Οι υπόλοιποι 287 (ποσοστό 78.63%) είχαν κάποιου είδους αιμορραγία. Συγκεκριμένα, 167 ασθενείς (ποσοστό 45.75%) είχαν αιμορραγικές θλάσεις, 40 ασθενείς (ποσοστό 10.95%) αιμορραγική αξονότμηση, 185 ασθενείς (ποσοστό 50.68%) υπαραχνοειδή αιμορραγία, 91 ασθενείς (ποσοστό 24.93%) υποσκληρίδιο αιμάτωμα, 24 ασθενείς (ποσοστό 6.57%) ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και τέλος 44 ασθενείς (ποσοστό 12.05%) είχαν ενδοκοιλική επέκταση της αιμορραγίας.

Τέλος, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την κλίμακα έκβασης Γλασκόβης (GOS) σε κατηγορίες ανάλογα με την κλινική εικόνα 6 μήνες μετά την ΚΕΚ. Συγκεκριμένα, 242 ασθενείς (ποσοστό 66.30%) είχαν πλήρη αποκατάσταση, 54 ασθενείς (ποσοστό 14.79%) είχαν μέτρια ανικανότητα, 33 ασθενείς (ποσοστό 9.04%) είχαν σοβαρή ανικανότητα, 21 ασθενείς (ποσοστό 5.75%) βρισκόταν σε φυτική κατάσταση και τέλος 15 άτομα (ποσοστό 4.11%) είχαν καταλήξει μέσα σε 6 μήνες μετά το συμβάν.

Επίσης, ανάλογα με την GOS 6μήνου δημιουργήθηκαν δύο κατηγορίες αποκατάστασης που εκφράζουν τη λειτουργική ή όχι ανεξαρτησία του ατόμου. Συγκεκριμένα, στην πρώτη κατηγορία της ευνοϊκής έκβασης περιλαμβάνονται τα στάδια 5 και 4 της GOS, ενώ στην κατηγορία της δυσμενούς έκβασης, στην οποία τα άτομα δεν επιβίωσαν ή δεν ήταν λειτουργικά ανεξάρτητα 6 μήνες μετά την κάκωση, περιλαμβάνονται τα στάδια 3, 2 και 1 της GOS. Έτσι, από το σύνολο των ασθενών, 296 άτομα (ποσοστό 81.09%) είχαν ευνοϊκή έκβαση μετά την ΚΕΚ, ενώ οι υπόλοιποι 69 ασθενείς (ποσοστό 18.91%) είχαν δυσμενή έκβαση.

Επιδημιολογικά και κλινικά στοιχεία των ασθενών με ΚΕΚ της μελέτης	
Ασθενείς	365
Άνδρες	305 (83.6%)
Γυναίκες	60 (16.4)
Μέση ηλικία (±SD) ασθενών	40.06±20.99
Αγγειακοί παράγοντες κινδύνου	
Υπέρταση (%)	57 (15,61%)
Στεφανιαία νόσος (%)	17 (4.65%)
Σακχαρώδης διαβήτης	26 (7.12%)
Υπερλιπιδαιμία (%)	45 (12.32%)
Κάπνισμα (%)	48 (13.15%)
Αλκοόλ (%)	109 (29.86%)
Κλινικά στοιχεία των ασθενών	
GCS στην εισαγωγή (μέση±SD)	10.99±3.85
GCS: 3-8	125 (34.24%)
GCS: 9-12	56 (15.34%)
GCS: 13-15	184 (50.41%)
6μηνη έκβαση των ασθενών	
Πλήρη αποκατάσταση (5)	242 (66.30%)
Μέτρια ανικανότητα (4)	54 (14.79%)
Σοβαρή ανικανότητα (3)	33 (9.04%)
Φυτική κατάσταση (2)	21 (5.75%)
Θάνατος (1)	15 (4.11%)
Ευνοϊκή έκβαση (4-5)	296 (81.09%)
Δυσμενής έκβαση (1-3)	69 (18.91%)
Ευρήματα στον απεικονιστικό έλεγχο του εγκεφάλου	
Χωρίς αιμορραγίες	78 (21.37%)
Με διαφόρων ειδών αιμορραγίες	287 (78.63%)
Αιμορραγικές θλάσεις	167 (45.75%)
Αιμορραγική αξονότμηση	40 (10.95%)
Υπαραχνοειδή αιμορραγία	185 (50.68%)
Επισκληρίδιο αιμάτωμα	55 (15.06%)
Υποσκληρίδιο αιμάτωμα	91 (24.9%)

Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία	24 (6.57%)
Ενδοκοιλική επέκταση της αιμορραγίας	44 (12.05%)
SD= τυπική απόκλιση, GCS= κλίμακα κώματος της Γλασκόβης	

Για τη μελέτη μας επιλέχθηκαν οι παρακάτω πολυμορφισμοί: IL-1β -511C/T (rs16944), IL-1β +3953C/T (rs1143634), IL-1α -889C/T (rs1800587), IL-1RA VNTR στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου (rs2234663), IL-2 +114G/T (rs2069763), IL-2 -384T/G (rs2069762) και της IL-6 -174G/C (rs1800795). Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται η θέση των πολυμορφισμών στο αντίστοιχο γονίδιο και χρωμόσωμα, η λειτουργία του και η συχνότητα του υπολειπόμενου αλληλομόρφου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό με βάση τα δεδομένα του Hapmap (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov, Protocol: Phase3 _Draft2).

	SNP	Αριθμός rs	Θέση στο χρωμόσωμα	Θέση στο γονίδιο	Λειτουργία	Minor allele frequency σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό
1.	IL-1α(-889C/T)	rs1800587	113259431 (chr 2)	Υποκινητής της IL-1α	Ρυθμιστική	0.252
2.	IL-1β(+3953C/T)	rs1143634	113306861 (chr 2)	5ο εξόνιο	Coding-synonymous	0.208
3.	IL-1β(-511C/T)	rs16944	113311338 (chr 2)	Υποκινητής της IL-1β	Ρυθμιστική	0.358
4.	IL-1RA (VNTR)	rs2234663	113604577 (chr 2)	2ο ιντρόνιο	No-coding	No data
5.	IL-2(+114G/T)	rs2069763	123596932 (chr 4)	1ο εξόνιο	Coding-synonymous	0.342
6.	IL-2(-384T/G)	rs2069762	123597430 (chr 4)	Υποκινητής της IL-2	Ρυθμιστική	0.273
7.	IL-6(-174G/C)	rs1800795	22733170 (chr 7)	Υποκινητής της IL-6	Ρυθμιστική	0.465

Στους πίνακες που ακολουθούν (1-7) καταγράφονται οι κατανομές των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των εξετασθέντων γονιδίων στους ασθενείς με ΚΕΚ και στις διάφορες υποκατηγορίες: ευνοϊκής ή μη έκβασης, κατηγορίες ανάλογα με την Γλασκόβη εισόδου και την ύπαρξη ή όχι αιμορραγικών φαινομένων.

Με τη χρήση του προγράμματος Fisher exact test εξετάστηκε κατά πόσο η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των διαφόρων γονιδίων που προσδιορίστηκαν βρισκόταν σε Hardy-Weinberg (H-W) ισορροπία. Βρέθηκε ότι οι γονότυποι των πολυμορφισμών IL-1β(-511C/T, rs16944), IL-1β(+3953C/T, rs1143634), IL-1α(-889C/T, rs1800587), IL-1RA (VNTR, rs2234663), IL-2(+114G/T, rs2069763), και της IL-6(-174G/C, rs1800795) βρισκόταν σε H-W ισορροπία (p>0.05), 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. Ωστόσο, οι γονότυποι στον πολυμορφισμό IL-2 (-384T/G, rs2069762) δε βρισκόταν H-W ισορροπία (p<0.01). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου στο δείγμα μας άτομα σε ομοζυγωτία GG, ενώ ανιχνεύτηκαν αρκετοί ετερόζυγοι TG (ποσοστό 59.18%), γεγονός που αντιβαίνει στους γνωστούς νόμους κληρονόμησης. Στη διεθνή βιβλιογραφία φαίνεται ότι και σε άλλες μελέτες υπήρχε το ίδιο πρόβλημα και δεν ανιχνεύτηκε ο GG γονότυπος [534]. Γενικότερα, δεν υπάρχει κάποια εξήγηση για αυτό το φαινόμενο. Έχει πιθανολογηθεί ότι μπορεί τα άτομα με GG γονότυπο να παρουσιάζουν ενδομήτρια ή πρώιμη θνητότητα γι’ αυτό και δεν ανιχνεύονται σε κάποιους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς.

Στους πίνακες 8-14 καταγράφονται οι αναλύσεις των συσχετίσεων των εξετασθέντων πολυμορφισμών στους εξής φαινότυπους των ασθενών με ΚΕΚ: 1) την κλινική εικόνα εισόδου όπως αυτή εκφράζεται με την GCS, 2) την κλινική έκβαση 6μήνου με βάση την GOS και 3) την ύπαρξη ή όχι αιμορραγικών φαινομένων κατά την εισαγωγή των ασθενών. Η επίδραση των γονοτύπων και των αλληλομόρφων σε αυτούς τους φαινότυπους ελέγχθηκε με βάση το επικρατητικό ή το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης και το μοντέλο της σύγκρισης-αντίθεσης των αλληλομόρφων (allele contrast). Ακολούθως, τα αποτελέσματα που προέκυψαν σταθεροποιήθηκαν με το μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression analysis) για άλλους παράγοντες κινδύνου που μπορεί να επηρεάζουν τους κλινικούς φαινότυπους. Έτσι, για τον έλεγχο της βαρύτητας της κλινικής εικόνας εισόδου η σταθεροποίηση έγινε για την ηλικία, το φύλο, την παρουσία αιμορραγίας, τον όγκο του αιματώματος και το διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα. Για τον έλεγχο της 6μηνης έκβασης η σταθεροποίηση έγινε επιπλέον των προηγούμενων παραγόντων και για την GCS εισόδου και την νευροχειρουργική επέμβαση. Τέλος, για τον έλεγχο της πιθανότητας αιμορραγίας μετά από ΚΕΚ η σταθεροποίηση έγινε για την ηλικία, το φύλο, το διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα, την GCS εισόδου και την νευροχειρουργική επέμβαση

Έγινε επίσης διόρθωση για πολλαπλές δοκιμασίες συγκρίσεων. Επειδή συνολικά ελέγξαμε 7 SNPs με βάση τη διόρθωση κατά Bonferroni το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας από 0.05 κατέρχεται στο 0.007. Έτσι, στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν μόνο οι τιμές p που ήταν μικρότερες από 0.007.

Από την ανάλυση των πολυμορφισμών της IL-1β(-511C/T, rs16944), της IL-1β(+3953C/T, rs1143634), της IL-1α(-889C/T, rs1800587), της IL-2 (-384T/G rs2069762) και της IL-6(-174G/C, rs1800795) δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Από την ανάλυση του πολυμορφισμού της IL-2(+114G/T, rs2069763) βρέθηκε ότι το αλληλόμορφο 2 (T) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα άτομα με GCS 3-8 και αυτών με GCS 13-15 με βάση τη σύγκριση των αλληλομόρφων (λόγος πιθανοτήτων [διάστημα εμπιστοσύνης] 0.57 [0.38-0.80], p=0.002) και στο επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης (0.53 [0.31-0.81], p=0.009). Στο υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης και με βάση τη διόρθωση κατά Bonferroni παρατηρήθηκε μια τάση προς συσχέτιση με p=0.02 και λόγος πιθανοτήτων 2.32 με διάστημα εμπιστοσύνης από 1.18 έως 5.12.

Από την ανάλυση του πολυμορφισμό της IL-1RA (VNTR, rs2234663) βρέθηκε ότι οι φορείς του αλληλομόρφου 2 (επικρατητικό μοντέλο) έχουν 4.5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση αιμορραγικών φαινομένων μετά από ΚΕΚ (λόγος πιθανοτήτων [διάστημα εμπιστοσύνης] 4.57 [1.67-12.96], p=0.004). Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και όταν συγκρίνουμε τις συχνότητες των αλληλομόρφων (0.26 [0.14-0.71], p=0.003).

Επίσης, στους φορείς του αλληλομόρφου 2 βρέθηκε ότι υπάρχει μια τάση για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου: σύγκριση GCS εισόδου 3-8 σε σχέση με GCS 9-12 (επικρατητικό μοντέλο 0.32 [0.12-0.90], p=0.030 και μοντέλο αντίθεσης αλληλίων 0.32 [0.16-0.83], p=0.02) και στη σύγκριση GCS εισόδου 3-8 σε σχέση με GCS 13-15 (επικρατητικό μοντέλο 0.37 [0.19-0.78], p=0.02 και μοντέλο σύγκρισης αλληλομόρφων 0.45 [0.25-0.91], p=0.017).

Τέλος, όσον αφορά την 6μηνη έκβαση, οι φορείς του αλληλομόρφου 2 είχαν μια τάση για ευνοϊκότερη έκβαση: επικρατητικό μοντέλο 0.39 [0.19-0.89], p=0.011 και μοντέλο σύγκρισης αλληλομόρφων 0.43 [0.19-0.86], p=0.035.

Πίνακας 1: Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της IL-1β (+3953C/T rs1143634)

	Γονότυποι							**Αλληλόμορφα**			
	1.1 (CC)	%	1.2 (CT)	%	2.2 (TT)	%		1 (C)	%	2 (T)	%
Ασθενείς (n=365)	211	57,81%	125	34,25%	29	7,95%		547	74,93%	183	25,07%
Καλή έκβαση (n=296)	172	58,11%	100	33,78%	24	8,11%		444	75,00%	148	25,00%
Κακή έκβαση (n=69)	39	56,52%	25	36,23%	5	7,25%		103	74,64%	35	25,36%
GCS 3-8 (n=125)	76	60,80%	40	32,00%	9	7,20%		192	76,80%	58	23,20%
GCS 9-12 (n=56)	29	51,79%	21	37,50%	6	10,71%		79	70,54%	33	29,46%
GCS 13-15 (n=184)	106	57,61%	64	34,78%	14	7,61%		276	75,00%	92	25,00%
Ασθενείς με αιμορραγίες (n=287)	167	58,19%	96	33,45%	24	8,36%		430	74,91%	144	25,09%
Ασθενείς χωρίς αιμορραγίες (n=78)	44	56,41%	29	37,18%	5	6,41%		117	75,00%	39	25,00%

Πίνακας 2: Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της IL-2 (-384T/G rs2069762)

	Γονότυποι							Αλληλόμορφα			
	1.1 (TT)	%	1.2 (TG)	%	2.2 (GG)	%		1 (T)	%	2 (G)	%
Ασθενείς (n=365)	149	40,82%	216	59,18%	0	0,00%		514	70,41%	216	29,59%
Καλή έκβαση (n=296)	120	40,54%	176	59,46%	0	0,00%		416	70,27%	176	29,73%
Κακή έκβαση (n=69)	29	42,03%	40	57,97%	0	0,00%		98	71,01%	40	28,99%
GCS 3-8 (n=125)	56	44,80%	69	55,20%	0	0,00%		181	72,40%	69	27,60%
GCS 9-12 (n=56)	22	39,29%	34	60,71%	0	0,00%		78	69,64%	34	30,36%
GCS 13-15 (n=184)	71	38,59%	113	61,41%	0	0,00%		255	69,29%	113	30,71%
Ασθενείς με αιμορραγίες (n=287)	116	40,42%	171	59,58%	0	0,00%		403	70,21%	171	29,79%
Ασθενείς χωρίς αιμορραγίες (n=78)	33	42,31%	45	57,69%	0	0,00%		111	71,15%	45	28,85%

Πίνακας 3: Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της IL-2 (+114G/T rs2069763)

	Γονότυποι							**Αλληλόμορφα**			
	1.1 (GG)	%	1.2 (GT)	%	2.2 (TT)	%		1 (G)	%	2 (T)	%
Ασθενείς (n=365)	183	50,14%	145	39,73%	37	10,14%		511	70,00%	219	30,00%
Καλή έκβαση (n=296)	150	50,68%	115	38,85%	31	10,47%		415	70,10%	177	29,90%
Κακή έκβαση (n=69)	33	47,83%	30	43,48%	6	8,70%		96	69,57%	42	30,43%
GCS 3-8 (n=125)	51	40,80%	55	44,00%	19	15,20%		157	62,80%	93	37,20%
GCS 9-12 (n=56)	27	48,21%	23	41,07%	6	10,71%		77	68,75%	35	31,25%
GCS 13-15 (n=184)	105	57,07%	67	36,41%	12	6,52%		277	75,27%	91	24,73%
Ασθενείς με αιμορραγίες (n=287)	145	50,52%	112	39,02%	30	10,45%		402	70,03%	172	29,97%
Ασθενείς χωρίς αιμορραγίες (n=78)	38	48,72%	33	42,31%	7	8,97%		109	69,87%	47	30,13%

Πίνακας 4: Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της IL-6 (-174C/G rs1800795)

	Γονότυποι							**Αλληλόμορφα**			
	1.1 (CC)	%	1.2 (CG)	%	2.2 (GG)	%		1 (C)	%	2 (G)	%
Ασθενείς (n=365)	225	61,64%	126	34,52%	14	3,84%		576	78,90%	154	21,10%
Καλή έκβαση (n=296)	181	61,15%	103	34,80%	12	4,05%		465	78,55%	127	21,45%
Κακή έκβαση (n=69)	44	63,77%	23	33,33%	2	2,90%		111	80,43%	27	19,57%
GCS 3-8 (n=125)	81	64,80%	41	32,80%	3	2,40%		203	81,20%	47	18,80%
GCS 9-12 (n=56)	29	51,79%	26	46,43%	1	1,79%		84	75,00%	28	25,00%
GCS 13-15 (n=184)	115	62,50%	59	32,07%	10	5,43%		289	78,53%	79	21,47%
Ασθενείς με αιμορραγίες (n=287)	177	61,67%	97	33,80%	13	4,53%		451	78,57%	123	21,43%
Ασθενείς χωρίς αιμορραγίες (n=78)	48	61,54%	29	37,18%	1	1,28%		125	80,13%	31	19,87%

Πίνακας 5: Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της IL-1RN (VNTR rs2234663)

	Γονότυποι											Αλληλόμορφα					
Πολυμορφισμός της IL-1RA	1.1	%	1.3	%	1.2	%	2.2	%	2.3	%		1	%	2	%	3	%
Ασθενείς (n=151)	81	53,64%	6	3,97%	51	33,77%	12	7,95%	1	0,66%		219	72,52%	76	25,17%	7	2,32%
Καλή έκβαση (n=119)	60	50,42%	3	2,52%	44	36,97%	11	9,24%	1	0,84%		167	70,17%	67	28,15%	4	1,68%
Κακή έκβαση (n=32)	21	65,63%	3	9,38%	7	21,88%	1	3,13%	0	0,00%		52	81,25%	9	14,06%	3	4,69%
GCS 3-8 (n=59)	24	40,68%	1	1,69%	27	45,76%	7	11,86%	0	0,00%		76	64,41%	41	34,75%	1	0,85%
GCS 9-12 (n=24)	15	62,50%	2	8,33%	7	29,17%	0	0,00%	0	0,00%		39	81,25%	7	14,58%	2	4,17%
GCS 13-15 (n=68)	42	61,76%	3	4,41%	17	25,00%	5	7,35%	1	1,47%		104	76,47%	28	20,59%	4	2,94%
Ασθενείς με αιμορραγίες (n=117)	55	47,01%	4	3,42%	46	39,32%	11	9,40%	1	0,85%		160	68,38%	69	29,49%	5	2,14%
Ασθενείς χωρίς αιμορραγίες (n=34)	26	76,47%	2	5,88%	5	14,71%	1	2,94%	0	0,00%		59	86,76%	7	10,29%	2	2,94%

Πίνακας 6: Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της IL-1β (-511C/T rs16944)

	Γονότυποι							Αλληλόμορφα			
	1.1 (CC)	%	1.2 (CT)	%	2.2 (TT)	%		1 (C)	%	2 (T)	%
Ασθενείς (n=151)	51	33,77%	83	54,97%	17	11,26%		185	61,26%	117	38,74%
Καλή έκβαση (n=119)	42	33,33%	69	54,76%	15	11,90%		153	60,71%	99	39,29%
Κακή έκβαση (n=32)	9	36,00%	14	56,00%	2	8,00%		32	64,00%	18	36,00%
GCS 3-8 (n=59)	20	33,90%	36	61,02%	3	5,08%		76	64,41%	42	35,59%
GCS 9-12 (n=24)	9	37,50%	11	45,83%	4	16,67%		29	60,42%	19	39,58%
GCS 13-15 (n=68)	22	32,35%	36	52,94%	10	14,71%		80	58,82%	56	41,18%
Αιμορραγίες (n=117)	36	30,77%	67	57,26%	14	11,97%		139	59,40%	95	40,60%
Χωρίς αιμορραγίες (n=34)	15	44,12%	16	47,06%	3	8,82%		46	67,65%	22	32,35%

Πίνακας 7: Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού της IL-1α (-889 C/T rs1800587)

	Γονότυποι							Αλληλόμορφα			
	1.1 (CC)	%	1.2 (CT)	%	2.2 (TT)	%		1 (C)	%	2 (T)	%
Ασθενείς (n=215)	107	49,77%	84	39,07%	24	11,16%		298	69,30%	132	30,70%
Καλή έκβαση (n=185)	93	50,27%	72	38,92%	20	10,81%		258	69,73%	112	30,27%
Κακή έκβαση (n=30)	14	46,67%	12	40,00%	4	13,33%		40	66,67%	20	33,33%
GCS 3-8 (n=64)	34	53,13%	24	37,50%	6	9,38%		92	71,88%	36	28,13%
GCS 9-12 (n=27)	9	33,33%	12	44,44%	6	22,22%		30	55,56%	24	44,44%
GCS 13-15 (n=124)	64	51,61%	48	38,71%	12	9,68%		176	70,97%	72	29,03%
Ασθενείς με αιμορραγίες (n=168)	82	48,81%	69	41,07%	17	10,12%		233	69,35%	103	30,65%
Ασθενείς χωρίς αιμορραγίες (n=47)	25	53,19%	15	31,91%	7	14,89%		65	69,15%	29	30,85%

Πίνακας 8: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-1β (+3953C/T rs1143634)

Αντίθεση αλληλίων [2] vs [1]				
	Αλλήλιο 2 (T)	Αλλήλιο 1 (C)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	148	444	-	
Κακή έκβαση (n=69)	35	103	1.03 [0.68-1.71]†	p=0.91
GCS 3-8 (n=125)	58	192	-	
GCS 9-12 (n=56)	33	79	1.35 [0.87-2.35]*	p=0.22
GCS 13-15 (n=184)	92	276	1.15 [0.69-1.73]*	p=0.65
Αιμορραγίες (n=287)	144	430	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	39	117	0.98 [0.68-1.53]‡	p=0.96
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [12+22] vs [11]				
	Γονότυποι [12+22] (T/-)	Γονότυπος [11] (CC)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	124	172	-	
Κακή έκβαση (n=69)	30	39	1.01 [0.68-1.84]†	p=0.82
GCS 3-8 (n=125)	49	76	-	
GCS 9-12 (n=56)	27	29	1.49 [0.73-2.77]*	p=0.28
GCS 13-15 (n=184)	78	106	1.16 [0.76-1.84]*	p=0.61
Αιμορραγίες (n=287)	120	167	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	34	44	1.03 [0.61-1.81]‡	p=0.75
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [22] vs [11+12]				
	Γονότυπος [22] (TT)	Γονότυποι [11+12] (C/-)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	24	272	-	
Κακή έκβαση (n=69)	5	64	1.16 [0.43-3.03]†	p=0.84
GCS 3-8 (n=125)	9	116	-	
GCS 9-12 (n=56)	6	50	0.68 [0.27-1.98]*	p=0.46
GCS 13-15 (n=184)	14	170	0.99 [0.41-2.63]*	p=0.85
Αιμορραγίες (n=287)	24	263	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	5	73	1.37 [0.46-3.66]‡	p=0.54

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.(†) σταθεροποίηση επιπλέον για GCS εισόδου και νευροχειρουργική επέμβαση. (‡)σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα GCS εισόδου και N/X επέμβαση

Πίνακας 9: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-2 (-384T/G rs2069762)				
Αντίθεση αλληλίων [2] vs [1]				
	Αλλήλιο 2 (G)	Αλλήλιο 1 (T)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	176	416	-	
Κακή έκβαση (n=69)	40	98	0.92 [0.68-1.90]†	p=0.84
GCS 3-8 (n=125)	69	181	-	
GCS 9-12 (n=56)	34	78	1.12 [0.79-1.81]*	p=0.52
GCS 13-15 (n=184)	113	255	1.15 [0.79-1.68]*	p=0.45
Αιμορραγίες (n=287)	171	403	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	45	111	0.98 [0.61-1.44]‡	p=0.85
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [12+22] vs [11]				
	Γονότυποι [12+22] (G/-)	Γονότυπος [11] TT)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	176	120	-	
Κακή έκβαση (n=69)	40	29	0.92 [0.59-1.83]†	p=0.87
GCS 3-8 (n=125)	69	56	-	
GCS 9-12 (n=56)	34	22	1.21 [0.63-2.37]*	p=0.46
GCS 13-15 (n=184)	113	71	1.45 [0.73-2.28]*	p=0.21
Αιμορραγίες (n=287)	171	116	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	45	33	0.91 [0.54-1.58]‡	p=0.78
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [22] vs [11+12]				
	Γονότυπος [22] (GG)	Γονότυποι [11+12] (T/-)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	0	296	-	
Κακή έκβαση (n=69)	0	69	0.21 [0.004-12.10]†	p=1.00
GCS 3-8 (n=125)	0	125	-	
GCS 9-12 (n=56)	0	56	0.42 [0.007-23.41]*	p=1.00
GCS 13-15 (n=184)	0	184	1.46 [0.035-77.63]*	p=1.00
Αιμορραγίες (n=287)	0	287	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	0	78	0.24 [0.004-16.45]‡	p=1.00

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.(†) σταθεροποίηση επιπλέον για GCS εισόδου και νευροχειρουργική επέμβαση. (‡)σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα GCS εισόδου και N/X επέμβαση

Πίνακας 10: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-2 (+114G/T rs2069763)				
Αντίθεση αλληλίων [2] vs [1]				
	Αλλήλιο 2 (T)	Αλλήλιο 1 (G)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	177	415	-	
Κακή έκβαση (n=69)	42	96	1.03 [0.67-1.57][†]	p=0.93
GCS 3-8 (n=125)	93	157	-	
GCS 9-12 (n=56)	35	77	0.767 [0.477-1.234]*	p=0.27371
GCS 13-15 (n=184)	91	277	**0.57 [0.38-0.80]***	**p=0.002**
Αιμορραγίες (n=287)	172	402	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	47	109	1.04 [0.67-1.51][‡]	p=0.94
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [12+22] vs [11]				
	Γονότυποι [12+22] (T/-)	Γονότυπος [11] (GG)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	146	150	-	
Κακή έκβαση (n=69)	36	33	1.17 [0.61-1.92][†]	p=0.64
GCS 3-8 (n=125)	74	51	-	
GCS 9-12 (n=56)	29	27	0.72 [0.36-1.41]*	p=0.37
GCS 13-15 (n=184)	79	105	**0.53 [0.31-0.81]***	**p=0.009**
Αιμορραγίες (n=287)	142	145	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	40	38	1.12 [0.68-1.79][‡]	p=0.75
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [22] vs [11+12]				
	Γονότυπος [22] (TT)	Γονότυποι [11+12] (G/-)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	31	265	-	
Κακή έκβαση (n=69)	6	63	1.27 [0.46-2.88][†]	p=0.61
GCS 3-8 (n=125)	19	106	-	
GCS 9-12 (n=56)	6	50	1.45 [0.58-3.52]*	p=0.48
GCS 13-15 (n=184)	12	172	**2.32 [1.18-5.12]***	**p=0.02**
Αιμορραγίες (n=287)	30	257	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	7	71	1.17 [0.48-2.55][‡]	p=0.65

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.(†) σταθεροποίηση επιπλέον για GCS εισόδου και νευροχειρουργική επέμβαση. (‡)σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα GCS εισόδου και Ν/Χ επέμβαση

Πίνακας 11: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-6 (-174C/G rs1800795)

Αντίθεση αλληλίων [2] vs [1]				
	Αλλήλιο 2 (G)	Αλλήλιο 1 (C)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	127	465	-	
Κακή έκβαση (n=69)	27	111	0.87 [0.52-1.55]†	p=0.68
GCS 3-8 (n=125)	47	203	-	
GCS 9-12 (n=56)	28	84	1.41 [0.87-2.32]*	p=0.19
GCS 13-15 (n=184)	79	289	1.167 [0.75-1.73]*	p=0.43
Αιμορραγίες (n=287)	123	451	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	31	125	0.93 [0.54-1.42]‡	p=0.68
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [12+22] vs [11]				
	Γονότυποι [12+22] (G/-)	Γονότυπος [11] (CC)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	115	181	-	
Κακή έκβαση (n=69)	25	44	0.87 [0.53-1.59]†	p=0.66
GCS 3-8 (n=125)	44	81	-	
GCS 9-12 (n=56)	27	29	1.74 [0.92-3.01]*	p=0.096
GCS 13-15 (n=184)	69	115	1.12 [0.67-1.81]*	p=0.67
Αιμορραγίες (n=287)	110	177	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	30	48	1.05 [0.64-1.71]‡	p=0.96
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [22] vs [11+12]				
	Γονότυπος [22] (GG)	Γονότυποι [11+12] (C/-)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=296)	12	284	-	
Κακή έκβαση (n=69)	2	67	1.42 [0.32-5.88]†	p=0.63
GCS 3-8 (n=125)	3	122	-	
GCS 9-12 (n=56)	1	55	1.31 [0.12-12.96]*	p=0.76
GCS 13-15 (n=184)	10	174	0.43 [0.12-1.60]*	p=0.21
Αιμορραγίες (n=287)	13	274	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=78)	1	77	3.63 [0.47-25.28]‡	p=0.19

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.(†) σταθεροποίηση επιπλέον για GCS εισόδου και νευροχειρουργική επέμβαση. (‡)σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα GCS εισόδου και N/X επέμβαση

Πίνακας 12: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-1RN (VNTR rs2234663)				
Αντίθεση αλληλίων [2] vs [1]				
	Αλλήλιο 2	Αλλήλιο 1	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=119)	67	167	-	
Κακή έκβαση (n=32)	9	52	**0.43 [0.19-0.86]†**	**p=0.035**
GCS 3-8 (n=59)	41	76	-	
GCS 9-12 (n=24)	7	39	**0.32 [0.16-0.83]***	**p=0.02**
GCS 13-15 (n=68)	28	104	**0.45 [0.25-0.91]***	**p=0.017**
Αιμορραγίες (n=117)	69	160	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=34)	7	59	**0.26 [0.14-0.71]‡**	**p=0.003**
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [12+22] vs [11]				
	Allele 2 carrier	Allele 2 non-carrier	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=119)	56	63	-	
Κακή έκβαση (n=32)	8	24	**0.37 [0.19-0.78]†**	**p=0.02**
GCS 3-8 (n=59)	34	25	-	
GCS 9-12 (n=24)	7	17	**0.32 [0.12-0.90]***	**p=0.030**
GCS 13-15 (n=68)	23	45	**0.39 [0.19-0.89]***	**p=0.011**
Αιμορραγίες (n=117)	58	59	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=34)	6	28	**4.57 [1.67-12.96]‡**	**p=0.004**
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [22] vs [11+12]				
	Γονότυπος [22]	Γονότυποι [11+12+1.3+2.3]	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=119)	11	108	-	
Κακή έκβαση (n=32)	1	31	2.83 [0.28-25.13]†	p=0.31
GCS 3-8 (n=59)	7	52	-	
GCS 9-12 (n=24)	0	24	6.31 [0.37-110.1]*	p=0.11
GCS 13-15 (n=68)	5	63	1.68 [0.514-5.52]*	p=0.47
Αιμορραγίες (n=117)	11	106	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=34)	1	33	3.21 [0.53-25.6]‡	p=0.25

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.(†) σταθεροποίηση επιπλέον για GCS εισόδου και νευροχειρουργική επέμβαση. (‡)σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα GCS εισόδου και Ν/Χ επέμβαση

Πίνακας 13: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-1β (-511C/T rs16944)				
Αντίθεση αλληλίων [2] vs [1]				
	Αλλήλιο 2 (T)	Αλλήλιο 1 (C)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=119)	99	153	-	
Κακή έκβαση (n=32)	18	32	0.82 [0.49-1.60]†	p=0.65
GCS 3-8 (n=59)	42	76	-	
GCS 9-12 (n=24)	19	29	1.17 [0.56-2.12]*	p=0.65
GCS 13-15 (n=68)	56	80	1.23 [0.77-1.98]*	p=0.38
Αιμορραγίες (n=117)	95	139	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=34)	22	46	0.73 [0.36-1.11]‡	p=0.29
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [12+22] vs [11]				
	Γονότυποι [12+22] (T/-)	Γονότυπος [11] (CC)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=119)	84	42	-	
Κακή έκβαση (n=32)	16	9	0.87 [0.33-1.96]†	p=0.63
GCS 3-8 (n=59)	39	20	-	
GCS 9-12 (n=24)	15	9	0.86 [0.32-2.29]*	p=0.755
GCS 13-15 (n=68)	46	22	1.00 [0.48-2.10]*	p=0.993
Αιμορραγίες (n=117)	80	37	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=34)	19	15	1.71 [0.78-3.73]‡	p=0.087
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [22] vs [11+12]				
	Γονότυπος [22] (TT)	Γονότυποι [11+12] (C/-)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=119)	15	111	-	
Κακή έκβαση (n=32)	2	23	1.51 [0.37-7.6]†	p=0.54
GCS 3-8 (n=59)	3	56	-	
GCS 9-12 (n=24)	4	20	0.23 [0.17-1.44]*	p=0.12
GCS 13-15 (n=68)	10	58	0.311 [0.151-1.22]*	p=0.10
Αιμορραγίες (n=117)	14	103	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=34)	3	31	1.48 [0.31-4.88]‡	p=0.65

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.(†) σταθεροποίηση επιπλέον για GCS εισόδου και νευροχειρουργική επέμβαση. (‡)σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα GCS εισόδου και Ν/Χ επέμβαση

Πίνακας 14: Ανάλυση συσχετίσεων του πολυμορφισμού της IL-1α (-889 C/T rs1800587)				
Αντίθεση αλληλίων [2] vs [1]				
	Αλλήλιο 2 (T)	Αλλήλιο 1 (C)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=185)	112	258	-	
Κακή έκβαση (n=30)	20	40	1.13 [0.61-1.91][†]	p=0.60
GCS 3-8 (n=64)	36	92	-	
GCS 9-12 (n=27)	24	30	1.85 [0.91-2.23]*	p=0.12
GCS 13-15 (n=124)	72	176	1.20 [0.63-1.92]*	p=0.81
Αιμορραγίες (n=168)	103	233	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=47)	29	65	1.02 [0.69-1.62][‡]	p=0.96
Επικρατητικό Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [12+22] vs [11]				
	Γονότυποι [12+22] (T/-)	Γονότυπος [11] (CC)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=185)	76	109	-	
Κακή έκβαση (n=30)	14	16	1.23 [0.55-2.74][†]	p=0.58
GCS 3-8 (n=64)	26	38	-	
GCS 9-12 (n=27)	13	14	1.12 [0.52-3.37]*	p=0.53
GCS 13-15 (n=124)	51	73	1.04 [0.56-1.87]*	p=0.93
Αιμορραγίες (n=168)	86	82	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=47)	22	25	0.81 [0.49-1.68][‡]	p=0.61
Υπολειπόμενο Μοντέλο για αλληλόμορφο 2 [22] vs [11+12]				
	Γονότυπος [22] (TT)	Γονότυποι [11+12] (C/-)	OR (95%CI)	p-value
Καλή έκβαση (n=185)	20	165	-	
Κακή έκβαση (n=30)	4	26	0.72 [0.23-2.44][†]	p=0.66
GCS 3-8 (n=64)	6	58	-	
GCS 9-12 (n=27)	6	21	0.35 [0.17-1.28]*	p=0.15
GCS 13-15 (n=124)	12	112	0.91 [0.32-2.12]*	p=0.91
Αιμορραγίες (n=168)	17	151	-	
Χωρίς αιμορραγίες (n=47)	7	40	0.69 [0.28-1.61][‡]	p=0.31

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.(†) σταθεροποίηση επιπλέον για GCS εισόδου και νευροχειρουργική επέμβαση. (‡)σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα GCS εισόδου και Ν/Χ επέμβαση

Ανάλυση απλοτύπων

Η ανάλυση των απλοτύπων των μελετηθέντων πολυμορφισμών καταγράφεται στους πίνακες 15 και 16. Χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση οι απλότυποι με συχνότητες στο δείγμα μας >0.05. Να σημειωθεί ότι στα αποτελέσματα της ανάλυσης των απλοτύπων έγινε διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες (όπως και με τα μεμονωμένα SNPs) και για πολλαπλές συγκρίσεις κατά Bonferroni.

Από την ανάλυση των απλοτύπων για τους πολυμορφισμούς της οικογένειας της IL-1 (IL-1α -889C/T, IL-1β +3953C/T, IL-1β -511C/T, IL-1RA VNTR) όσον αφορά την μελέτη της 6μηνης έκβασης αναγνωρίστηκαν 6 απλότυποι με συχνότητες στο δείγμα μας >0.05. Από αυτούς ο απλότυπος VI (2-1-1-1, που περιέχει το σπάνιο αλληλόμορφο του SNP IL-1α -889 C/T και τα συχνά αλληλόμορφα των υπολοίπων) σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για δυσμενή 6μηνη έκβαση των ασθενών με ΚΕΚ (λόγος πιθανοτήτων [διάστημα εμπιστοσύνης] 3.01 [1.59-5.69], p=0.0004). Το Global test συσχέτισης επίσης ήταν στατιστικά σημαντικό (p=0.0025).

Στη σύγκριση μεταξύ των ασθενών με GCS 3-8 έναντι αυτών με GCS 9-12 αναγνωρίσθηκαν δύο απλότυποι των οποίων οι συχνότητες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο αυτών υποομάδων. Ο απλότυπος IV (1-1-2-2) σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου (0.16 (0.05-0.51), p=0.0005), σε αντίθεση με τον απλότυπο VIII (2-2-2-1) που σχετιζόταν με μεγαλύτερη πιθανότητα για GCS εισόδου 9-12 (9.79 (2.74-34.98), $p=2.64*10^{-5}$). Το Global test συσχέτισης επίσης ήταν στατιστικά σημαντικό (p=0.0001). Από τη σύγκριση των απλοτύπων στις ομάδες των ασθενών με GCS 3-8 σε σχέση με αυτούς με GCS 13-15 δε βρέθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες των ασθενών με αιμορραγικά φαινόμενα σε σχέση με αυτούς χωρίς αιμορραγία ο απλότυπος IV (1-1-2-2) βρέθηκε να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για αιμορραγικά φαινόμενα (0.40 (0.20-0.78), p=0.0058). Το Global test συσχέτισης δεν ήταν στατιστικά σημαντικό (p=0.015, ενώ το α-επίπεδο μετά από τη διόρθωση κατά Bonferroni είναι 0.008). Οι πολυμορφισμοί της οικογένειας της IL-1 δε βρέθηκαν σε ανισορροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium) (πίνακας 17) με τη μεγαλύτερη τιμή του δείκτη D΄ (0,77840) να λαμβάνεται μεταξύ των πολυμορφισμών της IL-1α -889C/T και της IL-1β +3953C/T.

Από την ανάλυση των απλοτύπων για τους πολυμορφισμούς της IL-2 (IL-2 +114G/T και IL-2 -384T/G) δεν προέκυψαν κάποια σημαντικά στατιστικά ευρήματα όσον αφορά την έκβαση, την ύπαρξη αιμορραγικών φαινομένων και τη σύγκριση μεταξύ GCS 3-8 και GCS 9-12. Αντιθέτως, στη σύγκριση μεταξύ των ατόμων με GCS 3-8 σε σχέση με αυτούς με GCS 13-15 βρέθηκε ότι ο απλότυπος II (2-1) σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου (0.55 (0.39-0.78), p=0.00087). Το Global test συσχέτισης επίσης ήταν στατιστικά σημαντικό (p=0.0032). Η ανάλυση της ανισορροπίας σύνδεσης (Linkage Disequilibrium) έδειξε ισχυρό LD μεταξύ των δύο αυτών πολυμορφισμών όπως φαίνεται στον πίνακα 18 και στην γραφική αναπαράσταση της ανισορροπίας σύνδεσης.

Πίνακας 15: Ανάλυση Απλοτύπων των πολυμορφισμών της οικογένειας της IL-1

Haplotype	IL-1α(-889C/T) rs1800587	IL-1β(+3953C/T) rs1143634	IL-1β(-511C/T) rs16944	IL-1RA (VNTR) rs2234663	% στους ασθενείς με ευνοϊκή έκβαση	% στους ασθενείς με δυσμενή έκβαση	Fisher's p-value	OR (95%CI) [†]
I	1	1	1	1	26.5	23.7	0.58	0.88 (0.56-1.38)
II	2	2	1	1	16.3	12.0	0.22	0.70 (0.40-1.24)
III	1	1	2	1	15.8	21.2	0.09	1.49 (0.92-2.40)
IV	1	1	2	2	13.2	7.6	0.07	0.54 (0.27-1.07)
V	1	1	1	2	7.6	5.5	0.40	0.71 (0.32-1.58)
VI	**2**	**1**	**1**	**1**	**4.7**	**12.5**	**0.0004**	**3.01(1.59-5.69)**
				Global x^2=18.4	**Global Fisher's p-value=0.0025**			
Haplotype	IL-1α(-889C/T) rs1800587	IL-1β(+3953C/T) rs1143634	IL-1β(-511C/T) rs16944	IL-1RA (VNTR) rs2234663	% στους ασθενείς με GCS 3-8	% στους ασθενείς με GCS 9-12	Fisher's p-value	OR (95%CI)*
I	1	1	1	1	25.6	23.6	0.57	0.86 (0.51-1.45)
II	2	2	1	1	15.2	16.4	0.85	1.06 (0.57-1.95)
III	1	1	2	1	14.3	18.3	0.38	1.31 (0.71-2.38)
IV	**1**	**1**	**2**	**2**	**15.0**	**2.9**	**0.0005**	**0.16 (0.05-0.51)**
V	1	1	1	2	9.1	7.9	0.64	0.82 (0.36-1.86)
VI	2	1	1	1	7.1	8.3	0.73	1.15 (0.50-2.64)
VII	2	1	2	2	3.3	5.0	0.46	1.49 (0.50-4.47)
VIII	**2**	**2**	**2**	**1**	**1.2**	**11.4**	**$2.64*10^{-5}$**	**9.79 (2.74-34.98)**
				Global x^2= 29.05	**Global Fisher's p-value=0.0001**			

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.(†) σταθεροποίηση επιπλέον για GCS εισόδου και νευροχειρουργική επέμβαση.

Πίνακας 15 (συνέχεια): Ανάλυση απλοτύπων των πολυμορφισμών της οικογένειας της IL-1

Haplotype	IL-1α(-889C/T) rs1800587	IL-1β(+3953C/T) rs1143634	IL-1β(-511C/T) rs16944	IL-1RA (VNTR) rs2234663	% στους ασθενείς με GCS 3-8	% στους ασθενείς με GCS 13-15	Fisher's p-value	OR (95%CI)*
I	1	1	1	1	25.6	28.1	0.44	1.15 (0.79-1.68)
II	2	2	1	1	15.2	15.4	0.92	1.02 (0.65-1.61)
III	1	1	2	1	14.3	18.2	0.17	1.36 (0.86-2.13)
IV	1	1	2	2	15.0	13.3	0.54	0.86 (0.54-1.38)
V	1	1	1	2	9.1	5.7	0.10	0.59 (0.32-1.11)
VI	2	1	1	1	7.1	5.1	0.31	0.70 (0.36-1.38)
				Global x^2=5.55	Global Fisher's p-value=0.35			

Haplotype	IL-1α(-889C/T) rs1800587	IL-1β(+3953C/T) rs1143634	IL-1β(-511C/T) rs16944	IL-1RA (VNTR) rs2234663	% στους ασθενείς με αιμορραγίες	% στους ασθενείς χωρίς αιμορραγία	Fisher's p-value	OR (95%CI)[‡]
I	1	1	1	1	24.6	34.5	0.08	1.41 (0.95-2.08)
II	2	2	1	1	14.5	18.6	0.46	1.19 (0.74-1.91)
III	1	1	2	1	15.6	19.2	0.59	1.13 (0.71-1.80)
IV	**1**	**1**	**2**	**2**	**13.9**	**6.9**	**0.0058**	**0.40 (0.20-0.78)**
V	1	1	1	2	7.9	3.8	0.038	0.40 (0.17-0.97)
VI	2	1	1	1	5.3	8.1	0.31	1.42 (0.71-2.82)
				Global x^2=14.06	Global Fisher's p-value=0.015			

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα. ([‡])σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα GCS εισόδου και N/X επέμβαση

Πίνακας 16: Ανάλυση απλοτύπων των πολυμορφισμών της IL-2

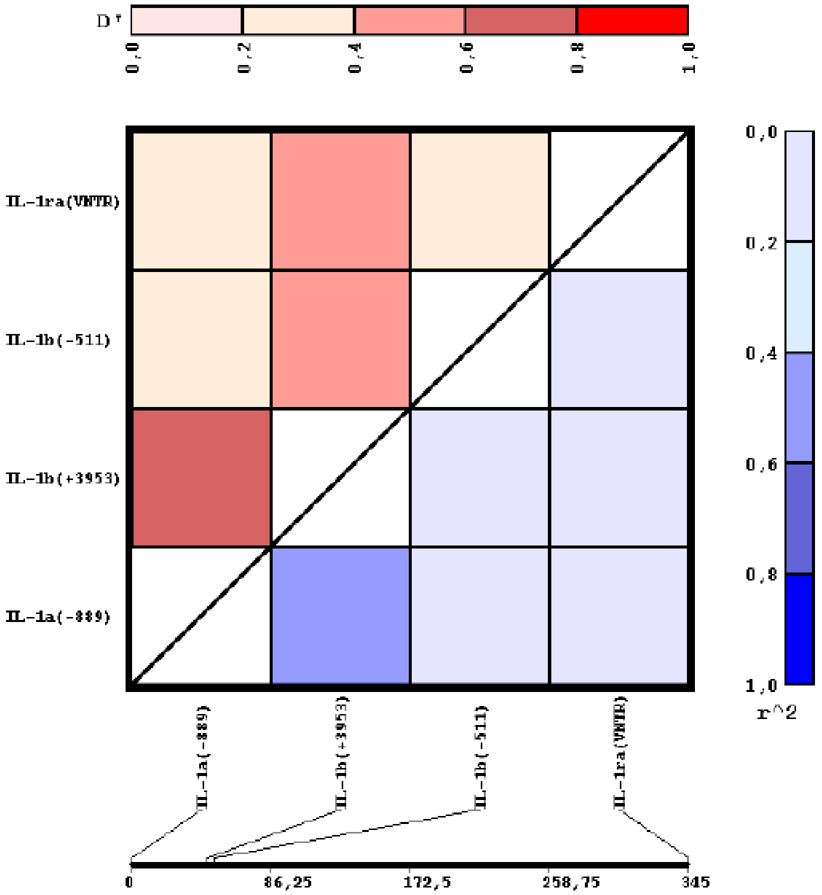
Haplotype	IL-2 (+114G/T) rs2069763	IL-2 (-384T/G) rs2069762	% στους ασθενείς με ευνοϊκή έκβαση	% στους ασθενείς με δυσμενή έκβαση	Fisher's p-value	OR (95%CI)†
I	1	1	40.4	40.6	0.96	1.01 (0.69-1.47)
II	2	1	29.9	30.4	0.90	1.02 (0.68-1.53)
III	1	2	29.7	29.0	0.86	0.96 (0.64-1.45)
		Global x^2=0.032	Global Fisher's p-value=0.98			
Haplotype	IL-2 (+114G/T) rs2069763	IL-2 (-384T/G) rs2069762	% στους ασθενείς με GCS 3-8	% στους ασθενείς με GCS 9-12	Fisher's p-value	OR (95%CI)*
I	1	1	35.2	38.4	0.55	1.14 (0.72-1.82)
II	2	1	37.2	31.2	0.27	0.76 (0.47-1.23)
III	1	2	27.6	30.4	0.59	1.14 (0.70-1.86)
		Global x^2=1.19	Global Fisher's p-value=0.54			
Haplotype	IL-2 (+114G/T) rs2069763	IL-2 (-384T/G) rs2069762	% στους ασθενείς με GCS 3-8	% στους ασθενείς με GCS 13-15	Fisher's p-value	OR (95%CI)*
I	1	1	35.2	44.6	0.02	1.48 (1.06-2.06
II	**2**	**1**	**37.2**	**24.7**	**0.00087**	**0.55 (0.39-0.78)**
III	1	2	27.6	30.7	0.41	1.16 (0.81-1.65)
		Global x^2=11.47	**Global Fisher's p-value=0.0032**			
Haplotype	IL-2 (+114G/T) rs2069763	IL-2 (-384T/G) rs2069762	% στους ασθενείς με αιμορραγίες	% στους ασθενείς χωρίς αιμορραγία	Fisher's p-value	OR (95%CI)‡
I	1	1	40.2	41.0	0.86	1.03 (0.72-1.48)
II	2	1	30.0	30.1	0.96	1.01 (0.68-1.48)
III	1	2	29.8	28.8	0.81	0.95 (0.64-1.41)
		Global x^2=0.056	Global Fisher's p-value=0.97			

(*) σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, παρουσία αιμορραγίας, όγκο αιματώματος και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα.(†) σταθεροποίηση επιπλέον για GCS εισόδου και νευροχειρουργική επέμβαση. (‡)σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο, διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα GCS εισόδου και Ν/Χ επέμβαση

Πίνακας 17: Ανισορροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium, LD) για τους πολυμορφισμούς της οικογένειας της IL-1 (chr 2) στους ασθενείς της μελέτης.

IL-1RA (VNTR)	0,38520	0,51583	0,34572	
IL-1b (-511)	0,35454	0,42757		0,06464
IL-1b (+3953)	0,77840		0,03784	0,02978
IL-1a (-889)		0,43222	0,03655	0,02345
D’ r^2	IL-1a (-889)	IL-1b (+3953)	IL-1b (-511)	IL-1RA (VNTR)

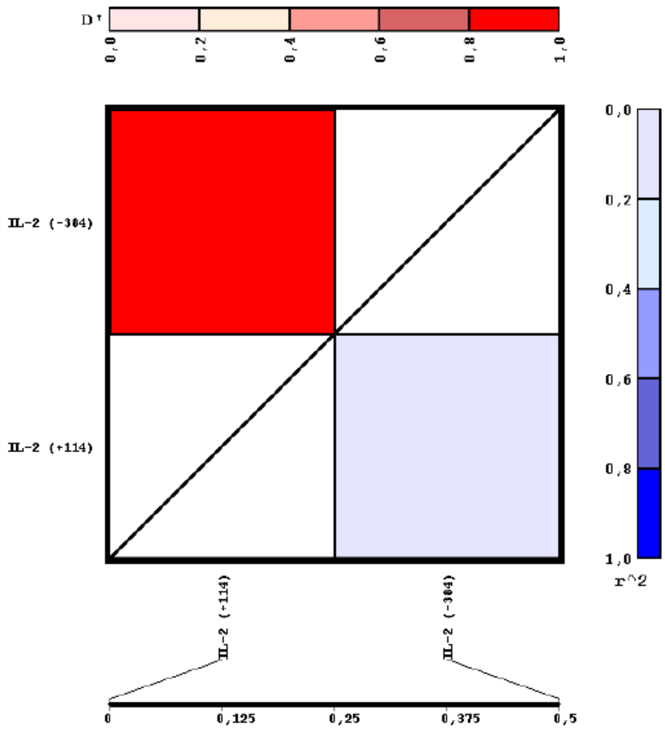
Εικόνα: Απεικόνιση της κατανομής της ανισορροπίας σύνδεσης (D΄ και r^2) στο δείγμα μας για τους πολυμορφισμούς της οικογένειας της IL-1 (chr 2).



Πίνακας 18: Ανισορροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium, LD) για τους πολυμορφισμούς της IL-2 (chr 4) στους ασθενείς της μελέτης.

IL-2 (-384)	1,00000	
IL-2 (+114)		0,18010
D’ r^2	IL-2 (+114)	IL-2 (-384)

Εικόνα: Απεικόνιση των δοκιμασιών της ανισορροπίας σύνδεσης (D΄ και r^2) στο δείγμα μας για τους πολυμορφισμούς της IL-2 (chr 4).



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έκβαση μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση παρουσιάζει σημαντική ποικιλομορφία, η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί πλήρως με τους μέχρι τώρα γνωστούς παράγοντες κινδύνου. Όλο και περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν διάφορους γενετικούς παράγοντες να εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ. Η έκταση της βλάβης του εγκεφάλου μετά από ΚΕΚ φαίνεται ότι επηρεάζεται σε κάποιο βαθμό από γενετικούς πολυμορφισμούς.

Μια σειρά πολύπλοκων δευτεροπαθών αλλοιώσεων επάγονται αμέσως μετά την ΚΕΚ 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 [53].

Τελευταία, όλο και περισσότερο γίνεται φανερό ότι η φλεγμονώδης αντίδραση διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από τραύμα [57]. Αυτή περιλαμβάνει τη διήθηση στο σημείο της βλάβης περιφερικών ανοσοποιητικών κυττάρων, την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών εγκεφαλικών κυττάρων (αστροκύτταρα, μικρογλοία) και την παραγωγή διαφόρων νευροτοξικών αλλά και νευροτροφικών ιντερλευκινών [356, 535].

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον για τον ρόλο των ιντερλευκινών και της φλεγμονής γενικότερα στις ΚΕΚ. Τα συμπεράσματα εξάγονται κυρίως μετά από μελέτες σε πειραματόζωα (συμπεριλαμβανομένων και διαγονιδιακών πειραματόζωων) με τη μέτρηση των ιντερλευκινών στον εγκέφαλο μετά από ΚΕΚ, αλλά και την παρακολούθηση της φλεγμονώδους απάντησης μετά την τοπική χορήγηση της υπό έρευνα ιντερλευκίνης ή του αναστολέα της στον τραυματισμένο εγκεφαλικό ιστό. Επιπλέον, σε ασθενείς με ΚΕΚ 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 παρούσα μελέτη βασίστηκε στην υπόθεση ότι οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων των ιντερλευκινών, λόγω της επίδρασής τους στην ένταση της φλεγμονώδους αντίδρασης, μπορούν να επηρεάσουν το βαθμό της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ και κατά συνέπεια την κλινική εικόνα και την έκβαση των ασθενών.

Για να είναι αξιόπιστη μια μελέτη γενετικής συσχέτισης απαιτείται το γονίδιο, από το οποίο θα επιλέξουμε κάποιο πολυμορφισμό για μελέτη, να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της νόσου, να υπάρχει με άλλα λόγια βιολογική σημαντικότητα και αιτιότητα.

Στη παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τα γονίδια των ιντερλευκινών IL-1α, IL-1β, IL-1RA, IL-2 και IL-6, τα οποία διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση μετά από ΚΕΚ. Από τα παραπάνω γονίδια επιλέχθηκαν να μελετηθούν λειτουργικοί πολυμορφισμοί, οι οποίοι επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου ή τη δομή της πρωτεΐνης και έχουν εκτεταμένα μελετηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία σε διάφορα νοσήματα.

Από την παρούσα μελέτη και παρά την ύπαρξη ισχυρού βιολογικού υπόβαθρου δεν προέκυψε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση για τους πολυμορφισμούς της IL-1β(-511C/T, rs16944), της IL-1β(+3953C/T, rs1143634), της IL-1α(-889C/T, rs1800587), και της IL-6(-174G/C, rs1800795).

Αντίθετα, προέκυψαν σημαντικά στοιχεία συμμετοχής των πολυμορφισμών της IL-1RA VNTR (rs2234663) και της IL-2 +114G/T (rs2069763) στο φαινότυπο των ασθενών με ΚΕΚ. Συγκεκριμένα, ο VNTR (rs2234663) πολυμορφισμός της IL-1RA βρέθηκε να επηρεάζει τη βαρύτητα της κλινικής εικόνας εισόδου, την 6μηνη έκβαση του ασθενών και την πιθανότητα για ανάπτυξη αιμορραγικών φαινομένων. Επίσης, ο +114G/T (rs2069763), πολυμορφισμός της IL-2 βρέθηκε να επηρεάζει την κλινική εικόνα εισόδου των ασθενών με ΚΕΚ. Να σημειωθεί ότι το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας λόγω της διόρθωσης κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις ήταν αρχικά χαμηλό στο 0.007, το οποίο αναδεικνύει και τη σημασία των ευρημάτων.

Η ανάλυση απλοτύπων επίσης κατέδειξε τη σημασία του συνδυασμού διαφόρων αλληλομόρφων σε όλους τους φαινότυπους που μελετήσαμε στους ασθενείς με ΚΕΚ. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την οικογένεια της IL-1 (IL-1α -889C/T, IL-1β +3953C/T, IL-1β -511C/T, IL-1RA VNTR) ο απλότυπος IV (1-1-2-2) βρέθηκε να επηρεάζει την κλινική εικόνα εισόδου και την εμφάνιση αιμορραγικών φαινομένων. Επίσης, οι απλότυποι VIII (2-2-2-1) και VI (2-1-1-1) βρέθηκαν να επηρεάζουν την κλινική εικόνα εισόδου και την 6μηνη έκβαση αντίστοιχα. Από την ανάλυση των απλοτύπων για τους πολυμορφισμούς της IL-2 (IL-2 +114G/T και IL-2 -384T/G) βρέθηκε ότι ο απλότυπος II (2-1) σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου.

Πολυμορφισμοί της IL-1β -511C/T (rs16944) και +3953C/T (rs1143634)

Για τη μελέτη μας επιλέξαμε δύο λειτουργικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου της IL-1β, στη θέση του υποκινητή (-511) και στο 5^{ο} εξόνιο (+3953) του γονιδίου που επηρεάζουν την έκφραση της IL-1β. Συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο T του πολυμορφισμού της IL-1β (-511 C/T) σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή IL-1β σε σχέση με το αντίστοιχό του C αλληλόμορφο [352], ενώ το αλληλόμορφο 2 της IL-1β (+3953 C/T) επίσης αντιπροσωπεύει ένα φαινότυπο υπερέκκρισης της IL-1β [266]. 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 [352, 533]. Σε πρόσφατη μελέτη [321], βρέθηκε αυξημένη συχνότητα των παραπάνω φλεγμονωδών αλληλομόρφων στα άτομα με κακή έκβαση μετά από ΚΕΚ. Παρόλα αυτά, στη δικιά μας μελέτη δεν επιβεβαιώθηκε η προηγούμενη συσχέτιση, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο σχετικά περιορισμένο αριθμό των ασθενών της δημοσιευμένης μελέτης (n=69) ή στο διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των δύο πληθυσμών.

Πολυμορφισμός της IL-1α -889C/T (rs1800587)

Στην θέση -889 του υποκινητή του γονιδίου της IL-1α έχει περιγραφεί ένας λειτουργικός πολυμορφισμός, ο οποίος επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου. Άτομα που φέρουν το λιγότερο συχνό αλληλόμορφο T σχετίζονται με αυξημένη μεταγραφική δραστικότητα του γονιδίου και παραγωγή της πρωτεΐνης [378]. Υπάρχουν αναφορές για συσχέτιση του πολυμορφισμού με ποικίλα νοσήματα, τα οποία εμπλέκουν φλεγμονώδεις μηχανισμούς μεταξύ των οποίων ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια [379] και νόσο Alzheimer [265]. Αντιθέτως, σε μια πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς που υπέστησαν ΚΕΚ δε βρέθηκε επίδραση του πολυμορφισμού στην εξάμηνη έκβαση [270]. Η δικιά μας μελέτη επιβεβαίωσε το προηγούμενο αποτέλεσμα σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και διαφορετικό πληθυσμιακό γενετικό υπόβαθρο [323]. Είναι πιθανόν ότι η συμμετοχή της IL-1α στην φλεγμονώδη αντίδραση μετά από ΚΕΚ δεν είναι τόσο σημαντική ώστε να επηρεάζει την έκβαση των ασθενών.

Πολυμορφισμός της IL-1RA VNTR (rs2234663)

Στη μελέτη μας επιλέξαμε επίσης να μελετήσουμε και το τρίτο μέλος της ομάδας της IL-1: την IL-1RA, η οποία είναι ο φυσικός αναστολέας της δράσης των ιντερλευκινών 1β και 1α. Ο πολυμορφισμός (VNTR, rs2234663) της IL-1RA αν και είναι ιντρονικός έχει μελετηθεί σε πληθώρα νοσημάτων και φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα ρύθμισης των επιπέδων της IL-1β και IL-1α και καθορισμού ενός προ-φλεγμονώδη φαινοτύπου [404].

Στη μελέτη μας από την ανάλυση του πολυμορφισμό της IL-1RA (VNTR, rs2234663) βρέθηκε ότι οι φορείς του αλληλομόρφου 2 (επικρατητικό μοντέλο) έχουν 4.5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση αιμορραγικών φαινομένων μετά από ΚΕΚ (λόγος πιθανοτήτων [διάστημα εμπιστοσύνης] 4.57 [1.67-12.96], p=0.004). Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και όταν συγκρίνουμε τις συχνότητες των αλληλομόρφων (0.26 [0.14-0.71], p=0.003).

Επίσης, στους φορείς του αλληλομόρφου 2 βρέθηκε ότι υπάρχει μια τάση για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου: σύγκριση GCS εισόδου 3-8 σε σχέση με GCS 9-12 (επικρατητικό μοντέλο 0.32 [0.12-0.90], p=0.030 και μοντέλο αντίθεσης αλληλίων 0.32 [0.16-0.83], p=0.02) και στη σύγκριση GCS εισόδου 3-8 σε σχέση με GCS 13-15 (επικρατητικό μοντέλο 0.37 [0.19-0.78], p=0.02 και μοντέλο σύγκρισης αλληλομόρφων 0.45 [0.25-0.91], p=0.017).

Τέλος, όσον αφορά την 6μηνη έκβαση, οι φορείς του αλληλομόρφου 2 είχαν μια τάση για ευνοϊκότερη έκβαση: επικρατητικό μοντέλο 0.39 [0.19-0.89], p=0.011 και μοντέλο σύγκρισης αλληλομόρφων 0.43 [0.19-0.86], p=0.035.

1. Πολυμορφισμός της IL-1RA VNTR (rs2234663) και αιμορραγικά φαινόμενα

Η κρανιοεγκεφαλική κάκωση μπορεί να καταλήξει σε ποικίλα αιμορραγικά φαινόμενα ανάλογα με τη σφοδρότητα του τραύματος. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη φανερώνει για πρώτη φορά ότι ο VNTR πολυμορφισμός του γονιδίου της IL-1RA αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα για την πρόκληση εγκεφαλικής αιμορραγίας μετά από τραύμα. Το αλληλόμορφο 2 της IL-1RA πιθανόν να αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο ευαισθησίας για την πρόκληση αιμορραγίας [322]. Αυτή η γενετική επίδραση πιθανόν να αντανακλά σε μια δομική ευαισθησία του αγγειακού τοιχώματος ή σε παρέμβαση στις διαδικασίες θρόμβωσης.

Το αλληλόμορφο 2 της IL-1RA σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα IL-1RA και ενισχυμένη παραγωγή IL-1β από τα μονοκύτταρα, ανεξάρτητα από τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο της IL-1β [351, 411]. Η διαλυτή μορφή της IL-1RA (sIL-1RA) εκκρίνεται κυρίως από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα [536]. Μια δεύτερη ενδοκυττάρια ισομορφή της IL-1RA (icIL-1RA1) εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα των ιστών, τους ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [537]. Η συσχέτιση του αλληλομόρφου 2 με μια ποικιλία ανθρώπινων νοσημάτων, κυρίως ενδοθηλιακής και επιθηλιακής προέλευσης, πιθανό να εξηγείται από το γεγονός ότι το αλληλόμορφο 2 της IL-1RA σχετίζεται με μειωμένη παραγωγή icIL-1RA1 από τα κύτταρα αυτά [404, 412]. Επίσης, η ενδοκυττάρια αυτή ισομορφή πιθανό να απελευθερώνεται από τα κύτταρα αυτά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και να αναστέλλει την πρόσδεση της IL-1 στους αντίστοιχους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας [404].

Σε μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη σε knockout ποντίκια για το γονίδιο της IL-1RA έχει βρεθεί ότι υπήρχε αυτόματη αρτηριακή φλεγμονή στα τοιχώματα των αγγείων αυτών των ποντικιών [399]. Συγκεκριμένα, 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 εντοπίζονταν σε διακλαδώσεις ή καμπές των αγγείων, οι οποίες στους ανθρώπους αποτελούν περιοχές υψηλής στροβιλώδους ροής του αίματος και σχηματισμού αθηροσκληρωτικών πλακών. Τα ομόζυγα ποντίκια πέθαιναν πρώιμα από αιμορραγία ως αποτέλεσμα ανευρυσματικής ρήξης που οφείλονταν σε χρόνιες εκφυλιστικές αλλοιώσεις του αρτηριακού τοιχώματος. Αντίθετα, τα ετερόζυγα 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 [399]. Είναι γνωστό ότι η IL-1RA είναι σημαντική στην αντιμετώπιση των επιβλαβών αποτελεσμάτων της IL-1.

Στη μελέτη μας υποθέτουμε ότι η χρόνια μειωμένη παραγωγή icIL-1RA1, όπως αυτό συμβαίνει στους φορείς του αλληλομόρφου 2 της IL-1RA, πιθανό να προκαλεί μεταβολές και ελαττώματα στο αγγειακό τοίχωμα που να προδιαθέτουν για αιμορραγία μετά από ποικίλες κακώσεις. Έχει περιγραφεί [412] ότι οι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο 2 έχουν 2 με 3 φορές χαμηλότερη παραγωγή icIL-1RA1 σε σχέση με τους ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο 1 της IL-1RA, ενώ η παραγωγή icIL-1RA1 στους ετεροζυγώτες βρίσκεται σε ένα ενδιάμεσο επίπεδο. Συνεπώς, η εγκεφαλική αιμορραγία που ακολουθεί το τραύμα πιθανόν να είναι το αποτέλεσμα δομικής ευαισθησίας του αγγειακού τοιχώματος που οφείλεται σε μειωμένη παραγωγή IL-1RA από το ενδοθήλιο.

Ανεξάρτητα από το ρόλο της IL-1RA στο τοίχωμα των αγγείων η θετική συσχέτιση στο δείγμα μας πιθανώς να προέκυψε λόγω εμπλοκής της IL-1RA στους μηχανισμούς της πήξης και την ισορροπία μεταξύ θρόμβωσης και αιμορραγίας. Μερικές μελέτες φανερώνουν ότι το αλληλόμορφο 2 της IL-1RA εξουδετερώνει τα θρομβογόνα αποτελέσματα της IL-1. Έτσι, παρόλο που το αλληλόμορφο 2 της IL-1RA σχετίστηκε με αθηροσκλήρυνση των καρωτίδων [538] και της στεφανιαίας αρτηρίας [539], φαίνεται να προστατεύει ενάντια στην επαναστένωση που ακολουθεί τη διαδερμική αγγειοπλαστική (stenting) της στεφανιαίας αρτηρίας [540, 541]. Αυτές οι αντικρουόμενες πληροφορίες πιθανόν να δικαιολογηθούν εάν υποθέσουμε ότι το αλληλόμορφο 2 της IL-1RA πιθανό να μεταβάλλει τις ομοιοστατικές ιδιότητες του ενδοθηλίου, για παράδειγμα με την αναστολή της προσκόλλησης και συνάθροισης των αιμοπεταλίων [402]. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτή η προστασία από τη θρόμβωση μπορεί να καταλήξει σε αιμορραγία σε μερικές περιστάσεις, όπως για παράδειγμα παρουσία μηχανικής βλάβης. Είναι φανερό ότι αυτή η επίδραση του αλληλομόρφου 2 της IL-1RA δε μπορεί να εξηγηθεί χρησιμοποιώντας τις υπάρχουσες πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία του πολυμορφισμού. Ίσως, τα αυξημένα επίπεδα της sIL-1RA του πλάσματος να αναστέλλουν τις θρομβογόνες επιδράσεις της IL-1.

Είναι γνωστό ότι οι κυτοκίνες δρουν σε ένα πολύ περιορισμένο μικροπεριβάλλον, ενώ έχουν πολλαπλές λειτουργίες και στόχους και συχνά επικαλυπτόμενα βιολογικά αποτελέσματα. Είναι δύσκολο και παρακινδυνευμένο να εικάζουμε και να συμπεραίνουμε χωρίς να διαθέτουμε δείγματα ιστών από την προσβεβλημένη περιοχή. Η μελέτη μας παρέχει ενδείξεις για πιθανή συσχέτιση του γονιδίου της IL-1RA με αιμορραγικά φαινόμενα μετά από ΚΕΚ. Περαιτέρω μελέτες σε πειραματικά μοντέλα απαιτούνται ώστε να επιβεβαιώσουν αυτή τη συσχέτιση και να ερευνήσουν πιθανούς παθογενετικούς μηχανισμούς.

2. Πολυμορφισμός της IL-1RA VNTR (rs2234663) και βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου

Από τη μελέτη μας προέκυψε ότι στους φορείς του αλληλομόρφου 2 υπάρχει μια τάση για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου. Συγκεκριμένα, υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση όταν συγκρίναμε τα άτομα με GCS εισόδου 3-8 έναντι αυτών με GCS 9-12 (επικρατητικό μοντέλο 0.32 [0.12-0.90], p=0.030 και μοντέλο αντίθεσης αλληλίων 0.32 [0.16-0.83], p=0.02). Στη σύγκριση μεταξύ GCS 3-8 και GCS 13-15 οι φορείς του αλληλομόρφου 2 είχαν μια τάση για βαρύτερη GCS εισόδου (επικρατητικό μοντέλο 0.37 [0.19-0.78], p=0.02 και μοντέλο σύγκρισης αλληλομόρφων 0.45 [0.25-

0.91], p=0.017). Το ίδιο καθίσταται φανερό αν παρατηρήσουμε τις συχνότητες του αλληλομόρφου 2 της IL-1RA στις υποομάδες των ατόμων με GCS 3-8, GCS 9-12 και GCS 13-15, όπου βλέπουμε ότι υπάρχει μια πτώση της συχνότητας του αλληλομόρφου 2 από 34,75% σε 14,58% και 20,59% αντίστοιχα.

Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί [71] ότι σε εγκεφάλους τρωκτικών που υπέστησαν πειραματικές βλάβες, όπως κρανιοεγκεφαλική κάκωση, εγκεφαλική ισχαιμία, ή ενδοεγκεφαλική χορήγηση τοξικών ουσιών, παρατηρείται γρήγορη επαγωγή IL-1β (mRNA μετάγραφα εντός 15min και πρωτεΐνη εντός 1h). Επίσης, σε κλινικές μελέτες ασθενών που υπέστησαν κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις ή εγκεφαλικό επεισόδιο έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση IL-1 στο ΕΝΥ [542] ή στον εγκεφαλικό ιστό μετά τον θάνατο του ασθενούς.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που υποστηρίζουν ότι στην οξεία φάση του εγκεφαλικού τραύματος η IL-1RA μειώνει την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης και την απόπτωση των νευρικών κυττάρων, ενώ η IL-1β επιδεινώνει το νευρωνικό θάνατο.

Συγκεκριμένα, η IL-1 παρόλο που δεν είναι τοξική στο φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό ή τους φυσιολογικούς νευρώνες, ενισχύει την τραυματική, ισχαιμική και τοξική εγκεφαλική βλάβη ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (pmoles) [78]. Έτσι, η ενδοεγκεφαλική, ενδοκοιλιακή ή εντός του ραβδωτού σώματος χορήγηση IL-1β σε πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν εγκεφαλική κάκωση επιδεινώνει δραματικά την εγκεφαλική βλάβη [85].

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 [543].

Σε μια πρόσφατη μελέτη [544], η υπερέκφραση της sIL-1RA από αστροκύτταρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα ποντικιών που υπέστησαν ΚΕΚ μειώνει το μέγεθος της βλάβης στο 50% και σχετίζεται με καθυστερημένη επαγωγή των φλεγμονωδών κυτοκινών και βελτιωμένη κλινική εικόνα. Μειώνει το οίδημα, αναστέλλει την ενεργοποίηση της γλοίας και την εισβολή των ουδετερόφιλων, προστατεύει τα νευρικά κύτταρα και βελτιώνει τη νευρολογική λειτουργικότητα των ζώων [108]. 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, όπως αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου σε αρουραίους [115], εγκεφαλικής βλάβης από χορήγηση τοξικών ουσιών σε αρουραίους ή ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης σε ποντίκια [139, 166, 545, 546] έδειξε σημαντικό περιορισμό της εγκεφαλικής βλάβης.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα μπορούμε να δικαιολογήσουμε γιατί οι φορείς του αλληλομόρφου 2 της IL-1RA παρουσιάζουν βαρύτερη κλινική εικόνα κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο όπως προέκυψε από τη δικιά μας μελέτη. Όπως έχει προαναφερθεί, το αλληλόμορφο 2 έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή IL-1β και μειωμένη παραγωγή icIL-1RA1. Έτσι, οι φορείς του αλληλομόρφου 2 της IL-1RA με εγκεφαλική κάκωση και λόγω του προ-φλεγμονώδη φαινοτύπου τους είναι πιθανό να παρουσιάζουν αυξημένη φλεγμονώδη αντίδραση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα και κατά συνέπεια αυξημένη εγκεφαλική βλάβη και βαρύτερη κλινική εικόνα. Βέβαια, επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για να επιβεβαιώσουν αυτήν την υπόθεση.

3. Πολυμορφισμός της IL-1RA VNTR (rs2234663) και ευνοϊκότερη 6μηνη έκβαση

Στη μελέτη μας βρέθηκε ότι οι φορείς του αλληλομόρφου 2 της IL-1RA παρουσιάζουν περισσότερες πιθανότητες για καλύτερη μακροχρόνια έκβαση. Συγκεκριμένα, οι φορείς του αλληλομόρφου 2 είχαν μια τάση για ευνοϊκότερη 6μηνη έκβαση όπως αυτή μετρήθηκε με βάση την κλίμακα έκβασης της Γλασκόβης: επικρατητικό μοντέλο 0.39 [0.19-0.89], p=0.011 και μοντέλο σύγκρισης αλληλομόρφων 0.43 [0.19-0.86], p=0.035.

Εκ πρώτης όψεως αυτό το εύρημα σε σχέση με το προηγούμενο της βαρύτερης κλινικής εικόνας εισόδου είναι αντιφατικό. Φαίνεται δηλαδή, ότι οι φορείς του αλληλομόρφου 2 ενώ στην οξεία φάση λόγω της έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης παρουσιάζουν αυξημένη εγκεφαλική βλάβη και βαρύτερη κλινική εικόνα, σε χρόνια φάση έχουν περισσότερες πιθανότητες για βελτίωση και αποκατάσταση. Παρόλα αυτά, ένα πλήθος παρατηρήσεων και πειραμάτων συμβαδίζει με το παραπάνω εύρημα, ότι δηλαδή κάτω από ορισμένες συνθήκες αυξημένη φλεγμονώδη αντίδραση μπορεί να συμβάλλει στην επιβίωση των νευρικών κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα, πολλές μελέτες αναφέρουν ότι, in vitro σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων, η IL-1 βελτιώνει την επιβίωση ποικίλων νευρωνικών κυτταρικών πληθυσμών. Επίσης, έχει αναφερθεί [547] ότι ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (Tumor necrosis factor, TNF) ($TNF^{-/-}$ mice), που είναι μια φλεγμονώδης κυτοκίνη με ίδιες περίπου ιδιότητες με την IL-1, παρουσιάζουν ηπιότερα συμπτώματα απώλειας συγκεκριμένης συμπεριφοράς μετά από ΚΕΚ σε σχέση με ποντίκια που διαθέτουν το φυσιολογικό γονίδιο (wild type mice). Παρόλα αυτά, σε βάθος χρόνου (4 εβδομάδες) τα $TNF^{-/-}$ ποντίκια δεν αναρρώνουν επαρκώς και υπολείπονται λειτουργικά σε σύγκριση με ποντίκια φυσιολογικού τύπου (wild type), τα οποία παρουσιάζουν θεαματική κλινική βελτίωση. Όταν οι εγκέφαλοι των ποντικιών αυτών εξετάσθηκαν παθολογοανατομικά τα TNF$^{-/-}$ ποντίκια ενώ στην οξεία φάση είχαν μικρές συγκριτικά βλάβες, κατά τη χρόνια περίοδο μετά την κάκωση παρουσίαζαν μεγαλύτερη απώλεια φλοιώδους νευρικού ιστού. Αυτά τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι η έκφραση ορισμένων φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF και πιθανότατα και η IL-1 (αν και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα), στην οξεία περίοδο μετά την κάκωση μπορεί να είναι καταστροφική, αλλά πιθανόν σε χρόνια φάση να συμμετέχει στη νευρωνική επιβίωση και επιδιόρθωση [78]. Βέβαια περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για επιβεβαίωση όλων αυτών των ευρημάτων και ειδικότερα σε ποντίκια που στερούνται τα γονίδια της IL-1α και IL-1β.

Υπάρχουν επίσης μελέτες οι οποίες αναδεικνύουν το ρόλο της IL-1 στην έκφραση νευροτροφικών παραγόντων. Έτσι, μετά από κάκωση του ΚΝΣ υπάρχει προσωρινή έκφραση νευροτροφικών παραγόντων γύρω από την περιοχή της κάκωσης, όπως ο NGF (Nerve Growth Factor) ή ο CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor). Έχει γενικά αποδειχτεί ότι οι νευροτροφικοί παράγοντες είναι σημαντικοί για την επιβίωση ποικίλων νευρωνικών πληθυσμών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε κυτταροκαλλιέργειες, η εξωγενής IL-1 είναι νευροπροστατευτική σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανό να οφείλεται στην απελευθέρωση ενδογενούς NGF [548]. Χορήγηση IL-1 μέσα στον εγκέφαλο εκτός των άλλων δράσεών του, συνεπάγεται και ενεργοποίηση του NGF [549, 550]. Επίσης, για την παραγωγή του CNTF [94] είναι απαραίτητη η έκκριση IL-1β. Αντίθετα, η IL-1RA καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό της μικρογλοίας και την παραγωγή του NGF [551]. Επιπρόσθετες νευροπροστατευτικές δράσεις της IL-1, ανεξάρτητες της σύνθεσης νευροτροφικών παραγόντων, είναι ότι η IL-1 προκαλεί αναστολή εισροής ιόντων Ca^{2+} [552] εντός των κυττάρων μετά την κάκωση, ενίσχυση της GABA δραστηριότητας [75] και επαγωγή της νεο-αγγειοποίησης [168]. Είναι πιθανόν ότι η IL-1 ασκεί πολλές από τις παραπάνω δράσεις, εξαρτώμενη από την περιοχή, το χρόνο της επαγωγής, τη συγκέντρωση, και το μικροπεριβάλλον και ότι οι ξεχωριστές αυτές διεργασίες ενισχύουν ή περιορίζουν το νευρωνικό θάνατο [543]. Τα παραπάνω στοιχεία παρέχουν ενδείξεις ότι η IL-1 και η φλεγμονή μπορούν να έχουν μια ωφέλιμη δράση στην αναγεννητική ικανότητα του ΚΝΣ.

Τέλος, μελέτες φανερώνουν ότι η IL-1β ρυθμίζει πρώιμες επουλωτικές απαντήσεις των κυττάρων του εγκεφάλου με σκοπό την επιδιόρθωση και αντικατάσταση των κατεστραμμένων ιστών. Επίσης, συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων συνδέσεων μεταξύ των νευρικών κυττάρων, λειτουργία η οποία συνιστά την νευρωνική πλαστικότητα [553, 554] και τον πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων

[555]. Η IL-1β επάγει τη νευρωνική ανάπτυξη του ιππόκαμπου μετά την κάκωση [95]. Επίσης, η IL-1β πιθανόν να συμμετέχει στην επιδιόρθωση των περιφερικών νεύρων στους αρουραίους [556]. Σε μοντέλα αρουραίων τα οποία μιμούνται την νόσο Parkinson, η εμφύτευση εντός του ραβδωτού σώματος βραδέως απελευθερούμενης IL-1β, ενισχύει τη νευρωνική ανάπτυξη από τους εναπομείναντες ντοπαμινεργικούς νευρώνες, γεγονός που σχετίζεται με τη ανάκτηση της λειτουργικότητας [557]. Η IL-1 επίσης φαίνεται να συνεισφέρει στη συναπτική πλαστικότητα και τις διαδικασίες εκμάθησης μνήμης, καθώς είναι σημαντική για τη διατήρηση της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (long-term potentiation) [558].

Με βάση τις παραπάνω νευροπροστατευτικές δράσεις της IL-1 μπορούμε να πιθανολογήσουμε γιατί οι φορείς του αλληλομόρφου 2 της IL-1RA παρουσιάζουν ευνοϊκότερη μακροχρόνια έκβαση όπως προέκυψε από τη δικιά μας μελέτη. Το αλληλόμορφο 2 της IL-1RA όπως έχει αναφερθεί συνιστά ένα προ-φλεγμονώδη φαινότυπο μιας και σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή IL-1β και μειωμένη παραγωγή icIL-1RA1. Έτσι, οι φορείς του αλληλομόρφου 2 της IL-1RA με εγκεφαλική κάκωση και λόγω του προ-φλεγμονώδη φαινοτύπου τους είναι πιθανό να παρουσιάζουν αυξημένη φλεγμονώδη αντίδραση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα σε μακροχρόνια βάση, η οποία πιθανώς να κινητοποιεί νευροπροστατευτικούς και επουλωτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι να συμβάλλουν στην γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη αποκατάσταση των βλαβών. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν αυτό το αποτέλεσμα και να ενισχύσουν αυτήν την υπόθεση.

Απλότυποι των πολυμορφισμών της IL-1

Από την ανάλυση των απλοτύπων για τους πολυμορφισμούς της οικογένειας της IL-1 (IL-1α -889C/T, IL-1β +3953C/T, IL-1β -511C/T, IL-1RA VNTR), οι πολυμορφισμοί δε βρέθηκαν μεταξύ τους σε ανισορροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium) με τη μεγαλύτερη τιμή του δείκτη D΄ (0,77840) να λαμβάνεται μεταξύ των πολυμορφισμών της IL-1α -889C/T και της IL-1β +3953C/T που βρίσκονται σε απόσταση 47K bp.

Από τους απλότυπους που βρέθηκαν να επηρεάζουν τους διαφόρους φαινότυπους των ασθενών με ΚΕΚ, όσον αφορά την κλινική εικόνα εισόδου βρέθηκε ότι ο απλότυπος IV (1-1-2-2) σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου (0.16 (0.05-0.51), p=0.0005) σε αντίθεση με τον απλότυπο VIII (2-2-2-1) που σχετιζόταν με μεγαλύτερη πιθανότητα για GCS εισόδου 9-12 (9.79 (2.74-34.98), $p=2.64*10^{-5}$). Στις συσχετίσεις αυτές πιθανώς να συμβάλλει κυρίως η παρουσία του αλληλομόρφου 2 του VNTR πολυμορφισμού της IL-1RA στον απλότυπο IV και η απουσία του ίδιου αλληλομόρφου στον απλότυπο VIII. Παρόμοια, ο απλότυπος IV (1-1-2-2) που περιέχει το αλληλομόρφου 2 του VNTR πολυμορφισμού της IL-1RA σχετίσθηκε με αιμορραγικά φαινόμενα (0.40 (0.20-0.78), p=0.0058). Τέλος, σημαντική συσχέτιση προέκυψε και για τον απλότυπο VI (2-1-1-1) που σχετίσθηκε με αυξημένο κίνδυνο για δυσμενή 6μηνη έκβαση των ασθενών με ΚΕΚ (λόγος πιθανοτήτων [διάστημα εμπιστοσύνης] 3.01 [1.59-5.69], p=0.0004).

Πολυμορφισμοί και απλότυποι του γονιδίου της IL-2 +114 (rs2069763) και -384 (rs2069762)

Στην μελέτη μας διερευνήσαμε το ρόλο του πολυμορφισμών της IL-2 στην ΚΕΚ. Η IL-2 είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη που εμπλέκεται κυρίως στην κυτταρική ανοσία. Επάγει τον πολλαπλασιασμό των NK (natural Killer) κυττάρων και την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών Th1 (T-helper 1) κυττάρων [346]. Στον ανθρώπινο εγκεφαλικό ιστό δεν έχει περιγραφεί ενδογενής κυτταρική πηγή IL-2. Η παραγωγή της IL-2 επάγεται μετά από ρήξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τη διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων [346]. Σε μελέτες σε πειραματόζωα με ΚΕΚ έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση IL-2 κατά τη διάρκεια της πρώιμης περιόδου μετά την κάκωση [444].

Από τους πολυμορφισμούς της IL-2 που μελετήσαμε, ο ένας πολυμορφισμός εντοπίζεται στην περιοχή -384 του υποκινητή του γονιδίου [458], επηρεάζει την παραγωγή της IL-2 [361] και έχει συσχετισθεί με δευτεροπαθώς προϊούσα σκλήρυνση κατά πλάκας [461]. Ο δεύτερος πολυμορφισμός εντοπίζεται εντός του πρώτου εξονίου του γονιδίου στην περιοχή +114 [459]. Πρόκειται για μια σιωπηλή μετάλλαξη, επειδή δεν παρατηρείται αλλαγή στο αμινοξύ της τριπλέτας που περιέχει τον πολυμορφισμό. Στην μελέτη μας δεν προέκυψε σημαντική συσχέτιση όσον αφορά τον -384 πολυμορφισμό.

Ωστόσο, από την ανάλυση του πολυμορφισμού +114G/T (rs2069763) της IL-2 βρέθηκε ότι το αλληλόμορφο 2 (T) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα άτομα με GCS 3-8 και αυτών με GCS 13-15 με βάση τη σύγκριση των αλληλομόρφων (λόγος πιθανοτήτων [διάστημα εμπιστοσύνης] 0.57 [0.38-0.80], p=0.002) και στο επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης (0.53 [0.31-0.81], p=0.009). Στο υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης και με βάση τη διόρθωση κατά Bonferroni παρατηρήθηκε μια τάση προς συσχέτιση με p=0.02, με λόγο πιθανοτήτων 2.32 και διάστημα εμπιστοσύνης από 1.18 έως 5.12.

Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ ατόμων με GCS 3-8 έναντι αυτών με GCS 9-12, εδώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Ωστόσο, αν παρατηρήσουμε τις συχνότητες του αλληλομόρφου T στις υποομάδες των ατόμων με GCS 3-8, GCS 9-12 και GCS 13-15, βλέπουμε ότι υπάρχει μια συνεχής πτώση της συχνότητας του T αλληλομόρφου από 37,20% σε 31,25% και 24,73% αντίστοιχα (πίνακας 3, σελ 143). Αυτό δείχνει ότι ενδεχομένως αν το δείγμα των ασθενών μας με ΚΕΚ ήταν μεγαλύτερο τότε φαίνεται ότι θα υπήρχε και στατιστικώς σημαντική συσχέτιση και ανάμεσα στα άτομα με GCS 3-8 έναντι αυτών με GCS 9-12.

Εν τούτοις ο πολυμορφισμός +114G/T (rs2069763) της IL-2 αν και εδράζεται στο $1^{ο}$ εξόνιο είναι μη λειτουργικός (CT**G**→CT**T**, Leu→Leu στη θέση 38 της πρωτεΐνης) και δε συνεπάγεται αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης. Είναι όμως πιθανό η συσχέτιση αυτή να οφείλεται σε άγνωστες αλληλεπιδράσεις σε επίπεδο mRNA ή ο πολυμορφισμός να βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium) με γειτονικό άγνωστο μέχρι σήμερα πολυμορφισμό, ο οποίος να είναι υπεύθυνος για αυτή τη συσχέτιση.

Σημαντικά ευρήματα προέκυψαν επίσης από την ανάλυση απλοτύπων των δύο παραπάνω πολυμορφισμών της IL-2 (IL-2 +114G/T και IL-2 -384T/G). Διαπιστώθηκε ότι ο απλότυπος II (2-1) σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου (σύγκριση GCS 3-8 με GCS 9-12: OR (95%C.I.) 0.55 (0.39-0.78), p=0.00087). Ο απλότυπος αυτός συνδυάζει το λιγότερο συχνό αλληλόμορφο του πολυμορφισμού +114G/T και το συχνότερο του πολυμορφισμού -384T/G. Το αλληλόμορφο 1 (T) του πολυμορφισμού -384T/G σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα IL-2 σε σχέση με το αλληλόμορφο 2 (G) [361]. Δηλαδή, στη μελέτη μας ένας απλότυπος χαμηλής έκκρισης IL-2 σχετίσθηκε με βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου. Είναι πιθανό η IL-2 να είναι απαραίτητη στη νευρωνική αποκατάσταση σε πρώιμη φάση.

Από την ανάλυση της ανισορροπίας σύνδεσης (Linkage Disequilibrium) μεταξύ των δύο αυτών πολυμορφισμών προέκυψε ισχυρό LD block (D΄=1.00 αλλά με r^2=0,18).

Πολυμορφισμός της IL-6 -174G/C (rs1800795)

Από τη μελέτη μας δεν προέκυψε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση για τον πολυμορφισμό -174G/C (rs1800795) της IL-6. Η IL-6 είναι επίσης μια κυτοκίνη που εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ. Η IL-6 έχει ρυθμιστικές, αντιφλεγμονώδεις και νευροτροφικές δράσεις και έχει συσχετισθεί με την προστασία των νευρώνων και την επιβίωσή τους [356]. Έχει βρεθεί ότι ποντίκια στα οποία υπάρχει έλλειψη της IL-6 έχουν αυξημένους αριθμούς αποπτωτικών κυττάρων μετά από κάκωση του εγκεφάλου [559]. Ωστόσο, χορήγηση IL-6 έχει βρεθεί είτε να αυξάνει είτε να αναστέλλει την βλάβη των νευρικών κυττάρων, το οποίο πιθανώς είναι αποτέλεσμα του χρόνου και της ποσότητας της IL-6 που χορηγήθηκε [77]. Σε ασθενείς με ΚΕΚ βρέθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις IL-6 στο ΕΝΥ, ενώ αυτή η αύξηση της IL-6 σχετιζόταν με καλύτερη νευρολογική έκβαση των ασθενών [560].

Στη μελέτη μας επιλέξαμε τον πολυμορφισμό -174G/C (rs1800795) της IL-6. Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται να ρυθμίζει τα επίπεδα της IL-6 στο πλάσμα in vivo [369, 512, 513] και το ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου της IL-6 [514]. Έχουν περιγραφεί 2 αλλήλια: αλλήλιο C (παρουσία κυτοσίνης), αλλήλιο G (παρουσία γουανίνης). Έχει βρεθεί ότι ο CC γονότυπος σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα IL-6 στο πλάσμα φυσιολογικών ατόμων, ενώ ο GG γονότυπος επάγει την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων IL-6 στο ανθρώπινο πλάσμα [515, 516]. Ωστόσο, σε μια μελέτη βρέθηκε ότι το C αλλήλιο δεν επηρέαζε τα επίπεδα της IL-6 [517], ενώ σε άλλη μελέτη ανιχνεύτηκαν υψηλά επίπεδα IL-6 ανάμεσα στους CC φορείς [518]. Η συχνότητα των αλληλίων διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών. Πιο συγκεκριμένα, σε μη-Καυκάσιους πληθυσμούς, η συχνότητα του G αλληλίου κυμαίνεται μεταξύ του 0.87-1.0, ενώ σε Καυκάσιους πληθυσμούς, αυτή μειώνεται στο 0.54-0.62 [519-521]. Ο πολυμορφισμός -174G/C (rs1800795) της IL-6 έχει μελετηθεί σε πληθώρα νοσημάτων και έχει βρεθεί να επηρεάζει τη συχνότητα και/ή τη σοβαρότητα διάφορων νοσημάτων. Αυτό πιθανό να οφείλεται σε αλλαγές στην έκφραση της IL-6, ανάλογα με τον γονότυπο του κάθε ασθενούς. Ωστόσο, σε μια μελέτη σε ασθενείς με ΚΕΚ δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση [272], το οποίο έρχεται σε συμφωνία με το δικό μας εύρημα.

Συμπερασματικά: από τη μελέτη μας προέκυψαν στοιχεία συμμετοχής γενετικών παραγόντων στην κλινική εικόνα εισόδου, στην εμφάνιση αιμορραγικών φαινομένων κατά την εισαγωγή και στην μακροχρόνια έκβαση των ασθενών μετά από ΚΕΚ. Οπωσδήποτε χρειάζεται επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών σε ακόμη μεγαλύτερα δείγματα και διαφορετικές εθνικότητες.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει πληθώρα μελετών που προσπαθούν να διαλευκάνουν την παθοφυσιολογία των ΚΕΚ και τους παράγοντες, οι οποίοι καθορίζουν την έκβαση των ασθενών. Βεβαίως δεν είναι σίγουρο αν και πότε αυτή η γνώση θα μπορέσει να οδηγήσει στην εισαγωγή νέων θεραπευτικών στρατηγικών που θα βελτιώσουν την κλινική πορεία και την έκβαση των ασθενών με ΚΕΚ.

Πολλές μελέτες γενετικής συσχέτισης έχουν αναδείξει ένα αριθμών γενετικών πολυμορφισμών, οι οποίοι συνεισφέρουν στην ευαισθησία για δυσμενή έκβαση μετά από ΚΕΚ. Οι μελέτες συσχέτισης αναμφισβήτητα συμβάλλουν καταρχήν στη διαλεύκανση της παθοφυσιολογίας των ΚΕΚ. Επιπλέον όμως, θα μπορούσαν στο μέλλον να έχουν και άλλες χρήσιμες συνέπειες, όπως για παράδειγμα την ανάπτυξη ειδικών γενετικών δεικτών για τον καθορισμό ειδικών μοριακών προφίλ του κάθε ατόμου και την εκτίμηση του κινδύνου για κάποιο συγκεκριμένο φαινότυπο. Για παράδειγμα, η ταυτοποίηση του γονοτύπου της apoE θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανίχνευση εκείνων των ατόμων με ΚΕΚ που θα απαντούσαν για παράδειγμα στη χορήγηση apoE ή σε στοχευμένες θεραπείες όπως η χορήγηση ενός μονοκλωνικού αντισώματος όπως το bapineuzumab, το οποίο στην παρούσα φάση δοκιμάζεται σε ασθενείς με νόσο Alzheimer, οι οποίοι έχουν ένα συγκεκριμένο APOE γονότυπο. Προς αυτήν την κατεύθυνση αισιοδοξία υπάρχει ως προς τη χρήση της ανασυνδυασμένης IL-1RA, η οποία ήδη βρίσκεται σε κλινική μελέτη φάσης ΙΙ σε ασθενείς με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο [535].

Είναι επίσης πιθανό με την ανίχνευση γενετικών δεικτών, όπως τα υψηλού ρίσκου αλληλόμορφα των ιντερλευκινών, να υπάρχει η δυνατότητα αναγνώρισης εκείνων των ατόμων με ΚΕΚ, οι οποίοι με βάση το γονιδιακό τους προφίλ έχουν ένα προ-φλεγμονώδη (proinflammatory) ή αντι-φλεγμονώδη (anti-inflammatory) φαινότυπο, και θα μπορούσαν να βοηθηθούν από μια πρώιμη αντιφλεγμονώδη αγωγή. Το γεγονός αυτό ίσως θα μπορούσε εν μέρει να εξηγήσει την απουσία σαφούς κλινικής αποτελεσματικότητας κλινικών δοκιμών χορήγησης αντιφλεγμονωδών φαρμάκων ή στεροειδών σε ασθενείς με ΚΕΚ [561].

Επιπλέον, η καλύτερη κατανόηση των σύνθετων γενετικών μονοπατιών θα μπορούσε να οδηγήσει στο μέλλον σε συγκεκριμένη γενετική παρέμβαση (genetic manipulation), για παράδειγμα με τη στόχευση γενετικών τροποποιητών όπως είναι οι υποκινητές (promoters) των γονιδίων [562]. Υπάρχει επίσης η πιθανότητα εξουδετέρωσης ή τροποποίησης παθολογικού mRNA, πρωτεϊνών ή των αγγελιοφόρων μεταγωγής σήματος [563].

Επίσης, ο καθορισμός των γενετικών πολυμορφισμών μεταβολικών ενζύμων θα μπορούσε να έχει ένα σαφές όφελος στην ανάπτυξη ειδικών θεραπευτικών στρατηγικών. Αυτή η φαρμακογονιδιωματική προσέγγιση (pharmacogenomics) είναι πιθανό να μπορεί να καθορίσει στο μέλλον τις βέλτιστες θεραπευτικές δόσεις των φαρμάκων, να ελαχιστοποιήσει την πιθανότητα ανεπιθύμητων ενεργειών και να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και τη συμμόρφωση των ασθενών [564]. Στο μέλλον όλες αυτές οι προσεγγίσεις είναι πιθανό να προσφέρουν μια προοπτική εξατομικευμένης εκτίμησης του κινδύνου για κάποιο νόσημα και νέων, βασισμένων στο γονιδίωμα στοχευμένων θεραπειών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ghajar J. Traumatic brain injury. Lancet 2000; 356:923-9.
2. Ommaya AK, Grubb RL, Jr., Naumann RA. Coup and contre-coup injury: observations on the mechanics of visible brain injuries in the rhesus monkey. J Neurosurg 1971; 35:503-16.
3. Adams JH, Graham DI, Murray LS, Scott G. Diffuse axonal injury due to nonmissile head injury in humans: an analysis of 45 cases. Ann Neurol 1982; 12:557-63.
4. Labadie EL, Glover D. Physiopathogenesis of subdural hematomas. Part 1: Histological and biochemical comparisons of subcutaneous hematoma in rats with subdural hematoma in man. J Neurosurg 1976; 45:382-92.
5. Annegers JF, Grabow JD, Groover RV, Laws ER, Jr., Elveback LR, Kurland LT. Seizures after head trauma: a population study. Neurology 1980; 30:683-9.
6. Annegers JF, Hauser WA, Coan SP, Rocca WA. A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. N Engl J Med 1998; 338:20-4.
7. Becker DP, Miller JD, Ward JD, Greenberg RP, Young HF, Sakalas R. The outcome from severe head injury with early diagnosis and intensive management. J Neurosurg 1977; 47:491-502.
8. Bouma GJ, Muizelaar JP, Choi SC, Newlon PG, Young HF. Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. J Neurosurg 1991; 75:685-93.
9. Martin NA, Patwardhan RV, Alexander MJ, Africk CZ, Lee JH, Shalmon E, Hovda DA, Becker DP. Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma: hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm. J Neurosurg 1997; 87:9-19.
10. Bergsneider M, Hovda DA, Shalmon E, Kelly DF, Vespa PM, Martin NA, Phelps ME, McArthur DL, Caron MJ, Kraus JF, Becker DP. Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans: a positron emission tomography study. J Neurosurg 1997; 86:241-51.
11. Verweij BH, Muizelaar JP, Vinas FC, Peterson PL, Xiong Y, Lee CP. Mitochondrial dysfunction after experimental and human brain injury and its possible reversal with a selective N-type calcium channel antagonist (SNX-111). Neurol Res 1997; 19:334-9.
12. Verweij BH, Muizelaar JP, Vinas FC, Peterson PL, Xiong Y, Lee CP. Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. J Neurosurg 2000; 93:815-20.
13. Signoretti S, Marmarou A, Tavazzi B, Lazzarino G, Beaumont A, Vagnozzi R. N-Acetylaspartate reduction as a measure of injury severity and mitochondrial dysfunction following diffuse traumatic brain injury. J Neurotrauma 2001; 18:977-91.
14. Sinson G, Bagley LJ, Cecil KM, Torchia M, McGowan JC, Lenkinski RE, McIntosh TK, Grossman RI. Magnetization transfer imaging and proton MR spectroscopy in the evaluation of axonal injury: correlation with clinical outcome after traumatic brain injury. AJNR Am J Neuroradiol 2001; 22:143-51.
15. Harris LK, Black RT, Golden KM, Reeves TM, Povlishock JT, Phillips LL. Traumatic brain injury-induced changes in gene expression and functional activity of mitochondrial cytochrome C oxidase. J Neurotrauma 2001; 18:993-1009.
16. Menzel M, Doppenberg EM, Zauner A, Soukup J, Reinert MM, Bullock R. Increased inspired oxygen concentration as a factor in improved brain tissue oxygenation and tissue lactate levels after severe human head injury. J Neurosurg 1999; 91:1-10.
17. Magnoni S, Ghisoni L, Locatelli M, Caimi M, Colombo A, Valeriani V, Stocchetti N. Lack of improvement in cerebral metabolism after hyperoxia in severe head injury: a microdialysis study. J Neurosurg 2003; 98:952-8.
18. Reinert M, Barth A, Rothen HU, Schaller B, Takala J, Seiler RW. Effects of cerebral perfusion pressure and increased fraction of inspired oxygen on brain tissue oxygen, lactate and glucose in patients with severe head injury. Acta Neurochir (Wien) 2003; 145:341-9; discussion 349-50.
19. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. Science 1989; 244:798-800.
20. Katayama Y, Becker DP, Tamura T, Hovda DA. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. J Neurosurg 1990; 73:889-900.

21. Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Swedlow PE, Styren SD, DeKosky ST. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. J Neurochem 1993; 61:2015-24.
22. Globus MY, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. J Neurochem 1995; 65:1704-11.
23. Marklund N, Clausen F, Lewander T, Hillered L. Monitoring of reactive oxygen species production after traumatic brain injury in rats with microdialysis and the 4-hydroxybenzoic acid trapping method. J Neurotrauma 2001; 18:1217-27.
24. Kontos HA. George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. Circ Res 1985; 57:508-16.
25. Kontos HA. Oxygen radicals in CNS damage. Chem Biol Interact 1989; 72:229-55.
26. Kontos HA, Povlishock JT. Oxygen radicals in brain injury. Cent Nerv Syst Trauma 1986; 3:257-63.
27. Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, Marmarou A, Young HF. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. J Neurosurg 1998; 89:507-18.
28. Kampfl A, Posmantur R, Nixon R, Grynspan F, Zhao X, Liu SJ, Newcomb JK, Clifton GL, Hayes RL. mu-calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. J Neurochem 1996; 67:1575-83.
29. Saatman KE, Graham DI, McIntosh TK. The neuronal cytoskeleton is at risk after mild and moderate brain injury. J Neurotrauma 1998; 15:1047-58.
30. Saatman KE, Murai H, Bartus RT, Smith DH, Hayward NJ, Perri BR, McIntosh TK. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:3428-33.
31. Posmantur R, Kampfl A, Siman R, Liu J, Zhao X, Clifton GL, Hayes RL. A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. Neuroscience 1997; 77:875-88.
32. Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. Am J Pathol 1995; 147:1575-83.
33. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. J Neurosci 1997; 17:7415-24.
34. Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. J Neurosci 1998; 18:5663-72.
35. Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, Hamilton RL, Loeffert JE, Graham SH. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. Faseb J 1999; 13:813-21.
36. Sinson G, Perri BR, Trojanowski JQ, Flamm ES, McIntosh TK. Improvement of cognitive deficits and decreased cholinergic neuronal cell loss and apoptotic cell death following neurotrophin infusion after experimental traumatic brain injury. J Neurosurg 1997; 86:511-8.
37. Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. J Neurotrauma 2000; 17:927-38.
38. Barzo P, Marmarou A, Fatouros P, Hayasaki K, Corwin F. Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. J Neurosurg 1997; 87:900-7.
39. Sansing LH, Kaznatcheeva EA, Perkins CJ, Komaroff E, Gutman FB, Newman GC. Edema after intracerebral hemorrhage: correlations with coagulation parameters and treatment. J Neurosurg 2003; 98:985-92.
40. Gopinath SP, Robertson CS, Contant CF, Hayes C, Feldman Z, Narayan RK, Grossman RG. Jugular venous desaturation and outcome after head injury. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994; 57:717-23.
41. Juul N, Morris GF, Marshall SB, Marshall LF. Intracranial hypertension and cerebral perfusion pressure: influence on neurological deterioration and outcome in severe head injury. The Executive Committee of the International Selfotel Trial. J Neurosurg 2000; 92:1-6.

42. Stein SC, Chen XH, Sinson GP, Smith DH. Intravascular coagulation: a major secondary insult in nonfatal traumatic brain injury. J Neurosurg 2002; 97:1373-7.
43. Park E, Bell JD, Baker AJ. Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? Cmaj 2008; 178:1163-70.
44. Eisenberg HM, Gary HE, Jr., Aldrich EF, Saydjari C, Turner B, Foulkes MA, Jane JA, Marmarou A, Marshall LF, Young HF. Initial CT findings in 753 patients with severe head injury. A report from the NIH Traumatic Coma Data Bank. J Neurosurg 1990; 73:688-98.
45. Bayir H, Clark RS, Kochanek PM. Promising strategies to minimize secondary brain injury after head trauma. Crit Care Med 2003; 31:S112-7.
46. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, Jane JA, Marmarou A, Foulkes MA. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. J Trauma 1993; 34:216-22.
47. Golding EM. Sequelae following traumatic brain injury. The cerebrovascular perspective. Brain Res Brain Res Rev 2002; 38:377-88.
48. Wahl M, Schilling L, Unterberg A, Baethmann A. Mediators of vascular and parenchymal mechanisms in secondary brain damage. Acta Neurochir Suppl (Wien) 1993; 57:64-72.
49. Rosomoff HL, Kochanek PM, Clark R, DeKosky ST, Ebmeyer U, Grenvik AN, Marion DW, Obrist W, Palmer AM, Safer P, White RJ. Resuscitation from severe brain trauma. Crit Care Med 1996; 24:S48-56.
50. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. Brain Res Brain Res Rev 2002; 39:55-73.
51. Raghupathi R, McIntosh TK, Smith DH. Cellular responses to experimental brain injury. Brain Pathol 1995; 5:437-42.
52. Hayes RL, Yang K, Raghupathi R, McIntosh TK. Changes in gene expression following traumatic brain injury in the rat. J Neurotrauma 1995; 12:779-90.
53. McIntosh TK. Neurochemical sequelae of traumatic brain injury: therapeutic implications. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1994; 6:109-62.
54. McIntosh TK, Smith DH, Meaney DF, Kotapka MJ, Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. Lab Invest 1996; 74:315-42.
55. Perry VH, Bolton SJ, Anthony DC, Betmouni S. The contribution of inflammation to acute and chronic neurodegeneration. Res Immunol 1998; 149:721-5.
56. Holmin S, Soderlund J, Biberfeld P, Mathiesen T. Intracerebral inflammation after human brain contusion. Neurosurgery 1998; 42:291-8; discussion 298-9.
57. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. Shock 2001; 16:165-77.
58. 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; 85:468-75.
59. 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; 20:7510-6.
60. Wong D, Dorovini-Zis K. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. J Neuroimmunol 1992; 39:11-21.
61. Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Zavala F. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. J Neuroimmunol 1993; 42:177-85.
62. Larsson LG, Gray HE, Totterman T, Pettersson U, Nilsson K. Drastically increased expression of MYC and FOS protooncogenes during in vitro differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84:223-7.
63. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. Neuron 1990; 4:477-85.
64. D'Mello SR, Heinrich G. Multiple signalling pathways interact in the regulation of nerve growth factor production in L929 fibroblasts. J Neurochem 1991; 57:1570-6.

65. Quitschke WW, Goldgaber D. The amyloid beta-protein precursor promoter. A region essential for transcriptional activity contains a nuclear factor binding domain. J Biol Chem 1992; 267:17362-8.
66. Dragunow M, Young D, Hughes P, MacGibbon G, Lawlor P, Singleton K, Sirimanne E, Beilharz E, Gluckman P. Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischaemic brain injury? Brain Res Mol Brain Res 1993; 18:347-52.
67. Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. Nature 1993; 363:166-9.
68. Pelham HR. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell 1986; 46:959-61.
69. Gonzalez MF, Shiraishi K, Hisanaga K, Sagar SM, Mandabach M, Sharp FR. Heat shock proteins as markers of neural injury. Brain Res Mol Brain Res 1989; 6:93-100.
70. Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. J Neurosci 1992; 12:4846-53.
71. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. Trends Neurosci 1995; 18:83-8.
72. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. Trends Neurosci 1995; 18:130-6.
73. Giulian D, Chen J, Ingeman JE, George JK, Noponen M. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. J Neurosci 1989; 9:4416-29.
74. Moreno-Flores MT, Bovolenta P, Nieto-Sampedro M. Polymorphonuclear leukocytes in brain parenchyma after injury and their interaction with purified astrocytes in culture. Glia 1993; 7:146-57.
75. Miller LG, Fahey JM. Interleukin-1 modulates GABAergic and glutamatergic function in brain. Ann N Y Acad Sci 1994; 739:292-8.
76. Bellinger FP, Madamba S, Siggins GR. Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. Brain Res 1993; 628:227-34.
77. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. Nat Rev Neurosci 2001; 2:734-44.
78. Rothwell N, Allan S, Toulmond S. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. J Clin Invest 1997; 100:2648-52.
79. Higgins GA, Olschowka JA. Induction of interleukin-1 beta mRNA in adult rat brain. Brain Res Mol Brain Res 1991; 9:143-8.
80. Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. J Neuroimmunol 1997; 72:169-77.
81. Minami M, Kuraishi Y, Yabuuchi K, Yamazaki A, Satoh M. Induction of interleukin-1 beta mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia. J Neurochem 1992; 58:390-2.
82. Knoblach SM, Faden AI. Cortical interleukin-1 beta elevation after traumatic brain injury in the rat: no effect of two selective antagonists on motor recovery. Neurosci Lett 2000; 289:5-8.
83. Blasi F, Riccio M, Brogi A, Strazza M, Taddei ML, Romagnoli S, Luddi A, D'Angelo R, Santi S, Costantino-Ceccarini E, Melli M. Constitutive expression of interleukin-1beta (IL-1beta) in rat oligodendrocytes. Biol Chem 1999; 380:259-64.
84. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 1996; 87:2095-147.
85. 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.
86. 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; 22:885-95.
87. Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. Am J Physiol 1992; 263:C1-16.
88. 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; 30:125-30.

89. Szaflarski J, Burtrum D, Silverstein FS. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. Stroke 1995; 26:1093-100.
90. Yan HQ, Banos MA, Herregodts P, Hooghe R, Hooghe-Peters EL. Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. Eur J Immunol 1992; 22:2963-71.
91. Woodroofe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A, Cuzner ML. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. J Neuroimmunol 1991; 33:227-36.
92. Wang CX, Olschowka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. Brain Res 1997; 759:190-6.
93. Rostworowski M, Balasingam V, Chabot S, Owens T, Yong VW. Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. J Neurosci 1997; 17:3664-74.
94. Herx LM, Rivest S, Yong VW. Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 beta is required for the production of ciliary neurotrophic factor. J Immunol 2000; 165:2232-9.
95. Fagan AM, Gage FH. Cholinergic sprouting in the hippocampus: a proposed role for IL-1. Exp Neurol 1990; 110:105-20.
96. Wang X, Barone FC, Aiyar NV, Feuerstein GZ. Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats. Stroke 1997; 28:155-61; discussion 161-2.
97. Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Siren AL. Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1beta (IL-1beta) and its receptor at mRNA and protein level. J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17:1107-20.
98. Frati A, Salvati M, Mainiero F, Ippoliti F, Rocchi G, Raco A, Caroli E, Cantore G, Delfini R. Inflammation markers and risk factors for recurrence in 35 patients with a posttraumatic chronic subdural hematoma: a prospective study. J Neurosurg 2004; 100:24-32.
99. Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O, Morganti-Kossmann C. Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. Shock 1995; 4:311-7.
100. Gruol DL, Nelson TE. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. Mol Neurobiol 1997; 15:307-39.
101. Zhao B, Schwartz JP. Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. J Neurosci Res 1998; 52:7-16.
102. Ott L, McClain CJ, Gillespie M, Young B. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. J Neurotrauma 1994; 11:447-72.
103. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. Stroke 1995; 26:676-80; discussion 681.
104. Loddick SA, Rothwell NJ. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16:932-40.
105. Lawrence CB, Allan SM, Rothwell NJ. Interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat. Eur J Neurosci 1998; 10:1188-95.
106. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA. Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94:2007-12.
107. 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; 21:5528-34.
108. Garcia JH, Liu KF, Relton JK. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. Am J Pathol 1995; 147:1477-86.

109. Sanderson KL, Raghupathi R, Saatman KE, Martin D, Miller G, McIntosh TK. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates regional neuronal cell death and cognitive dysfunction after experimental brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 1999; 19:1118-25.
110. Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. Immunol Today 1991; 12:404-10.
111. Relton JK, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. Brain Res Bull 1992; 29:243-6.
112. Toulmond S, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits neuronal damage caused by fluid percussion injury in the rat. Brain Res 1995; 671:261-6.
113. Relton JK, Martin D, Thompson RC, Russell DA. Peripheral administration of Interleukin-1 Receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat. Exp Neurol 1996; 138:206-13.
114. Rothwell NJ, Relton JK. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. Neurosci Biobehav Rev 1993; 17:217-27.
115. 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; 15:547-51.
116. Loddick SA, Wong ML, Bongiorno PB, Gold PW, Licinio J, Rothwell NJ. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. Biochem Biophys Res Commun 1997; 234:211-5.
117. Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Bluethmann H, Hidalgo J. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. Glia 1999; 25:343-57.
118. Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M, Eckenstein F. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. Stroke 2000; 31:1715-20.
119. Fassbender K, Mielke O, Bertsch T, Muehlhauser F, Hennerici M, Kurimoto M, Rossol S. Interferon-gamma-inducing factor (IL-18) and interferon-gamma in inflammatory CNS diseases. Neurology 1999; 53:1104-6.
120. Hedtjarn M, Leverin AL, Eriksson K, Blomgren K, Mallard C, Hagberg H. Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury. J Neurosci 2002; 22:5910-9.
121. Jander S, Schroeter M, Stoll G. Interleukin-18 expression after focal ischemia of the rat brain: association with the late-stage inflammatory response. J Cereb Blood Flow Metab 2002; 22:62-70.
122. Yatsiv I, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Dinarello CA, Novick D, Rubinstein M, Otto VI, Rancan M, Kossmann T, Redaelli CA, Trentz O, Shohami E, Stahel PF. Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. J Cereb Blood Flow Metab 2002; 22:971-8.
123. Menge T, Jander S, Stoll G. Induction of the proinflammatory cytokine interleukin-18 by axonal injury. J Neurosci Res 2001; 65:332-9.
124. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol 2003; 3:133-46.
125. Constantinescu CS, Frei K, Wysocka M, Trinchieri G, Malipiero U, Rostami A, Fontana A. Astrocytes and microglia produce interleukin-12 p40. Ann N Y Acad Sci 1996; 795:328-33.
126. Kornelisse RF, Hack CE, Savelkoul HF, van der Pouw Kraan TC, Hop WC, van Mierlo G, Suur MH, Neijens HJ, de Groot R. Intrathecal production of interleukin-12 and gamma interferon in patients with bacterial meningitis. Infect Immun 1997; 65:877-81.
127. Balashov KE, Smith DR, Khoury SJ, Hafler DA, Weiner HL. Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94:599-603.
128. Stahel PF, Kossmann T, Joller H, Trentz O, Morganti-Kossmann MC. Increased interleukin-12 levels in human cerebrospinal fluid following severe head trauma. Neurosci Lett 1998; 249:123-6.
129. Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. Neurosci Lett 1998; 251:189-92.

130. Knoblach SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. Exp Neurol 1998; 153:143-51.
131. Toulmond S, Vige X, Fage D, Benavides J. Local infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal cholinergic neurons. Neurosci Lett 1992; 144:49-52.
132. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18:176-9.
133. Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:10061-5.
134. Hartl R, Schurer L, Schmid-Schonbein GW, del Zoppo GJ. Experimental antileukocyte interventions in cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16:1108-19.
135. Hong L, Imeri L, Opp MR, Postlethwaite AE, Seyer JM, Krueger JM. Intercellular adhesion molecule-1 expression induced by interleukin (IL)-1 beta or an IL-1 beta fragment is blocked by an IL-1 receptor antagonist and a soluble IL-1 receptor. J Neuroimmunol 1993; 44:163-70.
136. Allan SM, Lawrence CB, Rothwell NJ. Interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist do not affect glutamate release or calcium entry in rat striatal synaptosomes. Mol Psychiatry 1998; 3:178-82.
137. Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. J Cereb Blood Flow Metab 1995; 15:42-51.
138. Soriano SG, Lipton SA, Wang YF, Xiao M, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Hickey PR. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. Ann Neurol 1996; 39:618-24.
139. Yang GY, Mao Y, Zhou LF, Gong C, Ge HL, Betz AL. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is reduced in permanent focal cerebral ischemic mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. Brain Res Mol Brain Res 1999; 65:143-50.
140. Allan SM. The role of pro- and antiinflammatory cytokines in neurodegeneration. Ann N Y Acad Sci 2000; 917:84-93.
141. Strijbos PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 beta attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor. J Neurosci 1995; 15:3468-74.
142. Brenneman DE, Schultzberg M, Bartfai T, Gozes I. Cytokine regulation of neuronal survival. J Neurochem 1992; 58:454-60.
143. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. J Neurochem 2000; 74:1-20.
144. 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; 11:2587-90.
145. Benveniste EN. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. Chem Immunol 1992; 52:106-53.
146. Thery C, Mallat M. Influence of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on the growth of microglial cells in primary cultures of mouse cerebral cortex: involvement of colony-stimulating factor 1. Neurosci Lett 1993; 150:195-9.
147. Giulian D, Vaca K, Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. J Neurosci 1993; 13:29-37.
148. Gadient RA, Cron KC, Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. Neurosci Lett 1990; 117:335-40.
149. Goss JR, O'Malley ME, Zou L, Styren SD, Kochanek PM, DeKosky ST. Astrocytes are the major source of nerve growth factor upregulation following traumatic brain injury in the rat. Exp Neurol 1998; 149:301-9.
150. Eng LF, Yu AC, Lee YL. Astrocytic response to injury. Prog Brain Res 1992; 94:353-65.
151. Giulian D. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. Glia 1993; 7:102-10.
152. Merrill JE. Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. Dev Neurosci 1991; 13:130-7.

153. Murakami N, Sakata Y, Watanabe T. Central action sites of interleukin-1 beta for inducing fever in rabbits. J Physiol 1990; 428:299-312.
154. Stroemer RP, Rothwell NJ. Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1beta in the rat. J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18:833-9.
155. Loddick SA, MacKenzie A, Rothwell NJ. An ICE inhibitor, z-VAD-DCB attenuates ischaemic brain damage in the rat. Neuroreport 1996; 7:1465-8.
156. Zhang Z, Chopp M, Goussev A, Powers C. Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. Brain Res 1998; 784:210-7.
157. Shibata M, Leffler CW, Busija DW. Recombinant human interleukin 1 alpha dilates pial arterioles and increases cerebrospinal fluid prostanoids in piglets. Am J Physiol 1990; 259:H1486-91.
158. Osuka K, Suzuki Y, Watanabe Y, Dogan A, Takayasu M, Shibuya M, Yoshida J. Vasodilator effects on canine basilar artery induced by intracisternal interleukin-1 beta. J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17:1337-45.
159. Katabami T, Shimizu M, Okano K, Yano Y, Nemoto K, Ogura M, Tsukamoto T, Suzuki S, Ohira K, Yamada Y, et al. Intracellular signal transduction for interleukin-1 beta-induced endothelin production in human umbilical vein endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1992; 188:565-70.
160. 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; 18:180-5.
161. Campbell VA, Segurado R, Lynch MA. Regulation of intracellular Ca2+ concentration by interleukin-1beta in rat cortical synaptosomes: an age-related study. Neurobiol Aging 1998; 19:575-9.
162. Murray CA, Clements MP, Lynch MA. Interleukin-1 induces lipid peroxidation and membrane changes in rat hippocampus: An age-related study. Gerontology 1999; 45:136-42.
163. Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM. Interleukin 1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest 1991; 87:602-8.
164. Hartung HP, Schafer B, Heininger K, Toyka KV. Recombinant interleukin-1 beta stimulates eicosanoid production in rat primary culture astrocytes. Brain Res 1989; 489:113-9.
165. Xia L, Matera C, Ferin M, Wardlaw SL. Interleukin-1 stimulates the central release of corticotropin-releasing hormone in the primate. Neuroendocrinology 1996; 63:79-84.
166. Yang GY, Liu XH, Kadoya C, Zhao YJ, Mao Y, Davidson BL, Betz AL. Attenuation of ischemic inflammatory response in mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18:840-7.
167. Yang Y, Quitschke WW, Brewer GJ. Upregulation of amyloid precursor protein gene promoter in rat primary hippocampal neurons by phorbol ester, IL-1 and retinoic acid, but not by reactive oxygen species. Brain Res Mol Brain Res 1998; 60:40-9.
168. Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. J Neurosci 1988; 8:709-14.
169. Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S. Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. Pharmacol Ther 1996; 69:85-95.
170. Goldgaber D, Harris HW, Hla T, Maciag T, Donnelly RJ, Jacobsen JS, Vitek MP, Gajdusek DC. Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86:7606-10.
171. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer’s disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. Nat Neurosci 1998; 1:355-8.
172. Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Licastro F, Annoni G, Biunno I, De Bellis G, Sorbi S, Mariani C, Canal N, Griffin WS, Franceschi M. Association of early-onset Alzheimer’s disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. Ann Neurol 2000; 47:361-5.
173. Nicoll JA, Mrak RE, Graham DI, Stewart J, Wilcock G, MacGowan S, Esiri MM, Murray LS, Dewar D, Love S, Moss T, Griffin WS. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer’s disease. Ann Neurol 2000; 47:365-8.

174. Mayeux R, Ottman R, Tang MX, Noboa-Bauza L, Marder K, Gurland B, Stern Y. Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives. Ann Neurol 1993; 33:494-501.
175. Gentleman SM, Graham DI, Roberts GW. Molecular pathology of head trauma: altered beta APP metabolism and the aetiology of Alzheimer's disease. Prog Brain Res 1993; 96:237-46.
176. Holmin S, Mathiesen T. Long-term intracerebral inflammatory response after experimental focal brain injury in rat. Neuroreport 1999; 10:1889-91.
177. Hoshino S, Tamaoka A, Takahashi M, Kobayashi S, Furukawa T, Oaki Y, Mori O, Matsuno S, Shoji S, Inomata M, Teramoto A. Emergence of immunoreactivities for phosphorylated tau and amyloid-beta protein in chronic stage of fluid percussion injury in rat brain. Neuroreport 1998; 9:1879-83.
178. Rothwell NJ, Busbridge NJ, Lefeuvre RA, Hardwick AJ, Gauldie J, Hopkins SJ. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. Can J Physiol Pharmacol 1991; 69:1465-9.
179. Luheshi G, Miller AJ, Brouwer S, Dascombe MJ, Rothwell NJ, Hopkins SJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. Am J Physiol 1996; 270:E91-5.
180. Shalaby MR, Waage A, Aarden L, Espevik T. Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. Clin Immunol Immunopathol 1989; 53:488-98.
181. Barnum SR. Complement in central nervous system inflammation. Immunol Res 2002; 26:7-13.
182. Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. Immunopharmacology 2000; 49:171-86.
183. Morgan BP, Gasque P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. Immunol Today 1996; 17:461-6.
184. Barnum SR. Inhibition of complement as a therapeutic approach in inflammatory central nervous system (CNS) disease. Mol Med 1999; 5:569-82.
185. van Beek J, Elward K, Gasque P. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. Ann N Y Acad Sci 2003; 992:56-71.
186. Elward K, Gasque P. "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. Mol Immunol 2003; 40:85-94.
187. Stahel PF, Barnum SR. Bacterial meningitis: complement gene expression in the central nervous system. Immunopharmacology 1997; 38:65-72.
188. Emmerling MR, Watson MD, Raby CA, Spiegel K. The role of complement in Alzheimer's disease pathology. Biochim Biophys Acta 2000; 1502:158-71.
189. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T. The role of the complement system in traumatic brain injury. Brain Res Brain Res Rev 1998; 27:243-56.
190. Kaczorowski SL, Schiding JK, Toth CA, Kochanek PM. Effect of soluble complement receptor-1 on neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats. J Cereb Blood Flow Metab 1995; 15:860-4.
191. Keeling KL, Hicks RR, Mahesh J, Billings BB, Kotwal GJ. Local neutrophil influx following lateral fluid-percussion brain injury in rats is associated with accumulation of complement activation fragments of the third component (C3) of the complement system. J Neuroimmunol 2000; 105:20-30.
192. Nataf S, Stahel PF, Davoust N, Barnum SR. Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? Trends Neurosci 1999; 22:397-402.
193. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Redaelli C, Gloor B, Trentz O, Kossmann T. Intrathecal levels of complement-derived soluble membrane attack complex (sC5b-9) correlate with blood-brain barrier dysfunction in patients with traumatic brain injury. J Neurotrauma 2001; 18:773-81.
194. Singhrao SK, Neal JW, Rushmere NK, Morgan BP, Gasque P. Spontaneous classical pathway activation and deficiency of membrane regulators render human neurons susceptible to complement lysis. Am J Pathol 2000; 157:905-18.

195. Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M. Complement activation in the human brain after traumatic head injury. J Neurotrauma 2001; 18:1295-311.
196. Redl H, Gasser H, Schlag G, Marzi I. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. Br Med Bull 1993; 49:556-65.
197. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. Br Med Bull 1993; 49:577-87.
198. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 1988; 255:H1269-75.
199. Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Sokolova TV, Ritov VB, Quinn PJ, Rose M, Kochanek P, Graham SH, Kagan VE. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. J Neurochem 2000; 75:2178-89.
200. Shohami E, Gati I, Beit-Yannai E, Trembovler V, Kohen R. Closed head injury in the rat induces whole body oxidative stress: overall reducing antioxidant profile. J Neurotrauma 1999; 16:365-76.
201. Beit-Yannai E, Kohen R, Horowitz M, Trembovler V, Shohami E. Changes of biological reducing activity in rat brain following closed head injury: a cyclic voltammetry study in normal and heat-acclimated rats. J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17:273-9.
202. Shohami E, Beit-Yannai E, Horowitz M, Kohen R. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17:1007-19.
203. Bayir H, Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin V, Ruppel RA, Adelson PD, Graham SH, Janesko K, Clark RS, Kochanek PM. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. Pediatr Res 2002; 51:571-8.
204. Touzani O, Boutin H, Chuquet J, Rothwell N. Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia. J Neuroimmunol 1999; 100:203-15.
205. Brakenhoff JP, de Hon FD, Fontaine V, ten Boekel E, Schooltink H, Rose-John S, Heinrich PC, Content J, Aarden LA. Development of a human interleukin-6 receptor antagonist. J Biol Chem 1994; 269:86-93.
206. Savino R, Lahm A, Salvati AL, Ciapponi L, Sporeno E, Altamura S, Paonessa G, Toniatti C, Ciliberto G. Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation. Embo J 1994; 13:1357-67.
207. Gijbels K, Brocke S, Abrams JS, Steinman L. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. Mol Med 1995; 1:795-805.
208. Suzuki H, Yasukawa K, Saito T, Goitsuka R, Hasegawa A, Ohsugi Y, Taga T, Kishimoto T. Anti-human interleukin-6 receptor antibody inhibits human myeloma growth in vivo. Eur J Immunol 1992; 22:1989-93.
209. Houlston RS, Snowden C, Green F, Alberti KG, Humphries SE. Apolipoprotein (apo) E genotypes by polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes: no detectable linkage disequilibrium between apo E and apo CII. Hum Genet 1989; 83:364-8.
210. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science 1988; 240:622-30.
211. Roses AD. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer’s disease. Annu Rev Med 1996; 47:387-400.
212. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families. Science 1993; 261:921-3.
213. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer’s disease. Neurology 1993; 43:1467-72.
214. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased

frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:1977-81.

215. Alberts MJ, Graffagnino C, McClenny C, DeLong D, Strittmatter W, Saunders AM, Roses AD. ApoE genotype and survival from intracerebral haemorrhage. Lancet 1995; 346:575.
216. Couderc R, Mahieux F, Bailleul S, Fenelon G, Mary R, Fermanian J. Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular disease. A case-control study. Stroke 1993; 24:661-4.
217. Friedman G, Froom P, Sazbon L, Grinblatt I, Shochina M, Tsenter J, Babaey S, Yehuda B, Groswasser Z. Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury. Neurology 1999; 52:244-8.
218. Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. Lancet 1997; 350:1069-71.
219. Graham DI, Horsburgh K, Nicoll JA, Teasdale GM. Apolipoprotein E and the response of the brain to injury. Acta Neurochir Suppl 1999; 73:89-92.
220. Herz J. Lipoprotein receptors: beacons to neurons? Trends Neurosci 2001; 24:193-5.
221. Horsburgh K, Kelly S, McCulloch J, Higgins GA, Roses AD, Nicoll JA. Increased neuronal damage in apolipoprotein E-deficient mice following global ischaemia. Neuroreport 1999; 10:837-41.
222. Horsburgh K, McCulloch J, Nilsen M, McCracken E, Large C, Roses AD, Nicoll JA. Intraventricular infusion of apolipoprotein E ameliorates acute neuronal damage after global cerebral ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab 2000; 20:458-62.
223. Mortimer JA, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Rocca WA, et al. Head trauma as a risk factor for Alzheimer’s disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. Int J Epidemiol 1991; 20 Suppl 2:S28-35.
224. Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Graham DI. beta A4 amyloid protein deposition in brain after head trauma. Lancet 1991; 338:1422-3.
225. Nicoll JA, Roberts GW, Graham DI. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head injury. Nat Med 1995; 1:135-7.
226. Chiang MF, Chang JG, Hu CJ. Association between apolipoprotein E genotype and outcome of traumatic brain injury. Acta Neurochir (Wien) 2003; 145:649-53; discussion 653-4.
227. Jordan BD, Relkin NR, Ravdin LD, Jacobs AR, Bennett A, Gandy S. Apolipoprotein E epsilon4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing. Jama 1997; 278:136-40.
228. Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, Repice A, Latorraca S, Forleo P, Amaducci L. ApoE as a prognostic factor for post-traumatic coma. Nat Med 1995; 1:852.
229. Liaquat I, Dunn LT, Nicoll JA, Teasdale GM, Norrie JD. Effect of apolipoprotein E genotype on hematoma volume after trauma. J Neurosurg 2002; 96:90-6.
230. Diaz-Arrastia R, Gong Y, Fair S, Scott KD, Garcia MC, Carlile MC, Agostini MA, Van Ness PC. Increased risk of late posttraumatic seizures associated with inheritance of APOE epsilon4 allele. Arch Neurol 2003; 60:818-22.
231. Liberman JN, Stewart WF, Wesnes K, Troncoso J. Apolipoprotein E epsilon 4 and short-term recovery from predominantly mild brain injury. Neurology 2002; 58:1038-44.
232. Sundstrom A, Marklund P, Nilsson LG, Cruts M, Adolfsson R, Van Broeckhoven C, Nyberg L. APOE influences on neuropsychological function after mild head injury: within-person comparisons. Neurology 2004; 62:1963-6.
233. Crawford FC, Vanderploeg RD, Freeman MJ, Singh S, Waisman M, Michaels L, Abdullah L, Warden D, Lipsky R, Salazar A, Mullan MJ. APOE genotype influences acquisition and recall following traumatic brain injury. Neurology 2002; 58:1115-8.
234. Ariza M, Pueyo R, Matarin Mdel M, Junque C, Mataro M, Clemente I, Moral P, Poca MA, Garnacho A, Sahuquillo J. Influence of APOE polymorphism on cognitive and behavioural outcome in moderate and severe traumatic brain injury. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2006; 77:1191-3.
235. Nathoo N, Chetry R, van Dellen JR, Connolly C, Naidoo R. Apolipoprotein E polymorphism and outcome after closed traumatic brain injury: influence of ethnic and regional differences. J Neurosurg 2003; 98:302-6.
236. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in

cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:9649-53.

237. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:8098-102.
238. Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. Nat Genet 1996; 14:55-61.
239. Arendt T, Schindler C, Bruckner MK, Eschrich K, Bigl V, Zedlick D, Marcova L. Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. J Neurosci 1997; 17:516-29.
240. Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM, Gauthier S. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:12260-4.
241. Fleming LM, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Troncoso JC, Johnson GV. Differential binding of apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins. Exp Neurol 1996; 138:252-60.
242. Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, Garcia MA, Aldudo J, Vazquez J, Valdivieso F. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. FEBS Lett 1998; 421:105-8.
243. Lambert JC, Araria-Goumidi L, Myllykangas L, Ellis C, Wang JC, Bullido MJ, Harris JM, Artiga MJ, Hernandez D, Kwon JM, Frigard B, Petersen RC, Cumming AM, Pasquier F, Sastre I, Tienari PJ, Frank A, Sulkava R, Morris JC, St Clair D, Mann DM, Wavrant-DeVrieze F, Ezquerra-Trabalon M, Amouyel P, Hardy J, Haltia M, Valdivieso F, Goate AM, Perez-Tur J, Lendon CL, Chartier-Harlin MC. Contribution of APOE promoter polymorphisms to Alzheimer's disease risk. Neurology 2002; 59:59-66.
244. Lambert JC, Mann D, Goumidi L, Harris J, Amouyel P, Iwatsubo T, Lendon C, Chartier-Harlin MC. Effect of the APOE promoter polymorphisms on cerebral amyloid peptide deposition in Alzheimer's disease. Lancet 2001; 357:608-9.
245. Lambert JC, Mann D, Richard F, Tian J, Shi J, Thaker U, Merrot S, Harris J, Frigard B, Iwatsubo T, Lendon C, Amouyel P. Is there a relation between APOE expression and brain amyloid load in Alzheimer's disease? J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005; 76:928-33.
246. Lendon CL, Harris JM, Pritchard AL, Nicoll JA, Teasdale GM, Murray G. Genetic variation of the APOE promoter and outcome after head injury. Neurology 2003; 61:683-5.
247. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. Science 2001; 292:1550-2.
248. Maruyama M, Higuchi M, Takaki Y, Matsuba Y, Tanji H, Nemoto M, Tomita N, Matsui T, Iwata N, Mizukami H, Muramatsu S, Ozawa K, Saido TC, Arai H, Sasaki H. Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. Ann Neurol 2005; 57:832-42.
249. Russo R, Borghi R, Markesbery W, Tabaton M, Piccini A. Neprylisin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. FEBS Lett 2005; 579:6027-30.
250. Mohajeri MH, Wollmer MA, Nitsch RM. Abeta 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. J Biol Chem 2002; 277:35460-5.
251. Mohajeri MH, Kuehnle K, Li H, Poirier R, Tracy J, Nitsch RM. Anti-amyloid activity of neprilysin in plaque-bearing mouse models of Alzheimer's disease. FEBS Lett 2004; 562:16-21.
252. Sakai A, Ujike H, Nakata K, Takehisa Y, Imamura T, Uchida N, Kanzaki A, Yamamoto M, Fujisawa Y, Okumura K, Kuroda S. Association of the Neprilysin gene with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord 2004; 17:164-9.
253. Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, Takahashi A, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. Association of neprilysin polymorphism with cerebral amyloid angiopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003; 74:749-51.

254. Johnson VE, Stewart W, Stewart JE, Graham DI, Praestgaard AH, Smith DH. A Neprilysin Polymorphism and Amyloid-beta Plaques Following Traumatic Brain Injury. J Neurotrauma 2009.
255. Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39:19-52.
256. Akil M, Kolachana BS, Rothmond DA, Hyde TM, Weinberger DR, Kleinman JE. Catechol-O-methyltransferase genotype and dopamine regulation in the human brain. J Neurosci 2003; 23:2008-13.
257. Diaz-Asper CM, Weinberger DR, Goldberg TE. Catechol-O-methyltransferase polymorphisms and some implications for cognitive therapeutics. NeuroRx 2006; 3:97-105.
258. Lipsky RH, Sparling MB, Ryan LM, Xu K, Salazar AM, Goldman D, Warden DL. Association of COMT Val158Met genotype with executive functioning following traumatic brain injury. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 2005; 17:465-71.
259. Ritchie T, Noble EP. Association of seven polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene with brain receptor-binding characteristics. Neurochem Res 2003; 28:73-82.
260. Small GW, Noble EP, Matsuyama SS, Jarvik LF, Komo S, Kaplan A, Ritchie T, Pritchard ML, Saunders AM, Conneally PM, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. D2 dopamine receptor A1 allele in Alzheimer disease and aging. Arch Neurol 1997; 54:281-5.
261. McAllister TW, Rhodes CH, Flashman LA, McDonald BC, Belloni D, Saykin AJ. Effect of the dopamine D2 receptor T allele on response latency after mild traumatic brain injury. Am J Psychiatry 2005; 162:1749-51.
262. Murzin AG, Lesk AM, Chothia C. beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. J Mol Biol 1992; 223:531-43.
263. Nicklin MJ, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. Genomics 1994; 19:382-4.
264. Du Y, Dodel RC, Eastwood BJ, Bales KR, Gao F, Lohmuller F, Muller U, Kurz A, Zimmer R, Evans RM, Hake A, Gasser T, Oertel WH, Griffin WS, Paul SM, Farlow MR. Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer’s disease. Neurology 2000; 55:480-3.
265. Rainero I, Bo M, Ferrero M, Valfre W, Vaula G, Pinessi L. Association between the interleukin-1alpha gene and Alzheimer’s disease: a meta-analysis. Neurobiol Aging 2004; 25:1293-8.
266. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. Eur J Clin Invest 1992; 22:396-402.
267. 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.
268. Yucesoy B, Peila R, White LR, Wu KM, Johnson VJ, Kashon ML, Luster MI, Launer LJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with dementia in a community-based sample: the Honolulu-Asia Aging Study. Neurobiol Aging 2006; 27:211-7.
269. Uzan M, Tanriverdi T, Baykara O, Kafadar A, Sanus GZ, Tureci E, Ozkara C, Uysal O, Buyra N. Association between interleukin-1 beta (IL-1beta) gene polymorphism and outcome after head injury: an early report. Acta Neurochir (Wien) 2005; 147:715-20; discussion 720.
270. Tanriverdi T, Uzan M, Sanus GZ, Baykara O, Is M, Ozkara C, Buyra N. Lack of association between the IL1A gene (-889) polymorphism and outcome after head injury. Surg Neurol 2006; 65:7-10; discussion 10.
271. Winter CD, Pringle AK, Clough GF, Church MK. Raised parenchymal interleukin-6 levels correlate with improved outcome after traumatic brain injury. Brain 2004; 127:315-20.
272. Minambres E, Cemborain A, Sanchez-Velasco P, Gandarillas M, Diaz-Reganon G, Sanchez-Gonzalez U, Leyva-Cobian F. Correlation between transcranial interleukin-6 gradient and outcome in patients with acute brain injury. Crit Care Med 2003; 31:933-8.
273. Fisher DE. The p53 tumor suppressor: critical regulator of life & death in cancer. Apoptosis 2001; 6:7-15.

274. Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. Nucleic Acids Res 1990; 18:4961.
275. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. Nat Genet 2003; 33:357-65.
276. Martinez-Lucas P, Moreno-Cuesta J, Garcia-Olmo DC, Sanchez-Sanchez F, Escribano-Martinez J, del Pozo AC, Lizan-Garcia M, Garcia-Olmo D. Relationship between the Arg72Pro polymorphism of p53 and outcome for patients with traumatic brain injury. Intensive Care Med 2005; 31:1168-73.
277. Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. Lab Invest 1987; 56:345-8.
278. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest 1990; 86:1343-6.
279. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. Am J Hum Genet 1992; 51:197-205.
280. Narain Y, Yip A, Murphy T, Brayne C, Easton D, Evans JG, Xuereb J, Cairns N, Esiri MM, Furlong RA, Rubinsztein DC. The ACE gene and Alzheimer’s disease susceptibility. J Med Genet 2000; 37:695-7.
281. Elkins JS, Douglas VC, Johnston SC. Alzheimer disease risk and genetic variation in ACE: a meta-analysis. Neurology 2004; 62:363-8.
282. Amouyel P, Richard F, Cottel D, Amant C, Codron V, Helbecque N. The deletion allele of the angiotensin I converting enzyme gene as a genetic susceptibility factor for cognitive impairment. Neurosci Lett 1996; 217:203-5.
283. Richard F, Berr C, Amant C, Helbecque N, Amouyel P, Alperovitch A. Effect of the angiotensin I-converting enzyme I/D polymorphism on cognitive decline. The EVA Study Group. Neurobiol Aging 2000; 21:75-80.
284. Stewart R, Powell J, Prince M, Mann A. ACE genotype and cognitive decline in an African-Caribbean population. Neurobiol Aging 2004; 25:1369-75.
285. Richard F, Fromentin-David I, Ricolfi F, Ducimetiere P, Di Menza C, Amouyel P, Helbecque N. The angiotensin I converting enzyme gene as a susceptibility factor for dementia. Neurology 2001; 56:1593-5.
286. Ariza M, Matarin MD, Junque C, Mataro M, Clemente I, Moral P, Antonia Poca M, Garnacho A, Sahuquillo J. Influence of Angiotensin-converting enzyme polymorphism on neuropsychological subacute performance in moderate and severe traumatic brain injury. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 2006; 18:39-44.
287. 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; 276:47863-8.
288. Kors EE, Terwindt GM, Vermeulen FL, Fitzsimons RB, Jardine PE, Heywood P, Love S, van den Maagdenberg AM, Haan J, Frants RR, Ferrari MD. Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: role of the CACNA1A calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. Ann Neurol 2001; 49:753-60.
289. Katzman R, Galasko DR, Saitoh T, Chen X, Pay MM, Booth A, Thomas RG. Apolipoprotein-epsilon4 and head trauma: Synergistic or additive risks? Neurology 1996; 46:889-91.
290. Mehta KM, Ott A, Kalmijn S, Slooter AJ, van Duijn CM, Hofman A, Breteler MM. Head trauma and risk of dementia and Alzheimer’s disease: The Rotterdam Study. Neurology 1999; 53:1959-62.
291. Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, Helms MJ, Newman TN, Drosdick D, Phillips C, Gau BA, Welsh-Bohmer KA, Burke JR, Guralnik JM, Breitner JC. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer’s disease and other dementias. Neurology 2000; 55:1158-66.
292. Lichtman SW, Seliger G, Tycko B, Marder K. Apolipoprotein E and functional recovery from brain injury following postacute rehabilitation. Neurology 2000; 55:1536-9.
293. Guo Z, Cupples LA, Kurz A, Auerbach SH, Volicer L, Chui H, Green RC, Sadovnick AD, Duara R, DeCarli C, Johnson K, Go RC, Growdon JH, Haines JL, Kukull WA,

Farrer LA. Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. Neurology 2000; 54:1316-23.
294. Kutner KC, Erlanger DM, Tsai J, Jordan B, Relkin NR. Lower cognitive performance of older football players possessing apolipoprotein E epsilon4. Neurosurgery 2000; 47:651-7; discussion 657-8.
295. Harding D, Dhamrait S, Millar A, Humphries S, Marlow N, Whitelaw A, Montgomery H. Is interleukin-6 -174 genotype associated with the development of septicemia in preterm infants? Pediatrics 2003; 112:800-3.
296. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science 1994; 264:1415-21.
297. Chamelian L, Reis M, Feinstein A. Six-month recovery from mild to moderate Traumatic Brain Injury: the role of APOE-epsilon4 allele. Brain 2004; 127:2621-8.
298. Koponen S, Taiminen T, Kairisto V, Portin R, Isoniemi H, Hinkka S, Tenovuo O. APOE-epsilon4 predicts dementia but not other psychiatric disorders after traumatic brain injury. Neurology 2004; 63:749-50.
299. Teasdale GM, Murray GD, Nicoll JA. The association between APOE epsilon4, age and outcome after head injury: a prospective cohort study. Brain 2005; 128:2556-61.
300. Leclercq PD, Murray LS, Smith C, Graham DI, Nicoll JA, Gentleman SM. Cerebral amyloid angiopathy in traumatic brain injury: association with apolipoprotein E genotype. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005; 76:229-33.
301. Stauber DJ, Debler EW, Horton PA, Smith KA, Wilson IA. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:2788-93.
302. Jiang Y, Sun X, Xia Y, Tang W, Cao Y, Gu Y. Effect of APOE polymorphisms on early responses to traumatic brain injury. Neurosci Lett 2006; 408:155-8.
303. Isoniemi H, Kurki T, Tenovuo O, Kairisto V, Portin R. Hippocampal volume, brain atrophy, and APOE genotype after traumatic brain injury. Neurology 2006; 67:756-60.
304. Ponsford J, Rudzki D, Bailey K, Ng KT. Impact of apolipoprotein gene on cognitive impairment and recovery after traumatic brain injury. Neurology 2007; 68:619-20.
305. Han SD, Drake AI, Cessante LM, Jak AJ, Houston WS, Delis DC, Filoteo JV, Bondi MW. Apolipoprotein E and traumatic brain injury in a military population: evidence of a neuropsychological compensatory mechanism? J Neurol Neurosurg Psychiatry 2007; 78:1103-8.
306. Hiekkanen H, Kurki T, Brandstack N, Kairisto V, Tenovuo O. MRI changes and ApoE genotype, a prospective 1-year follow-up of traumatic brain injury: a pilot study. Brain Inj 2007; 21:1307-14.
307. Zhou W, Xu D, Peng X, Zhang Q, Jia J, Crutcher KA. Meta-analysis of APOE4 allele and outcome after traumatic brain injury. J Neurotrauma 2008; 25:279-90.
308. Willemse-van Son AH, Ribbers GM, Hop WC, van Duijn CM, Stam HJ. Association between apolipoprotein-epsilon4 and long-term outcome after traumatic brain injury. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2008; 79:426-30.
309. Tanriverdi F, Taheri S, Ulutabanca H, Caglayan AO, Ozkul Y, Dundar M, Selcuklu A, Unluhizarci K, Casanueva FF, Kelestimur F. Apolipoprotein E3/E3 genotype decreases the risk of pituitary dysfunction after traumatic brain injury due to various causes: preliminary data. J Neurotrauma 2008; 25:1071-7.
310. Brichtova E, Kozak L. Apolipoprotein E genotype and traumatic brain injury in children--association with neurological outcome. Childs Nerv Syst 2008; 24:349-56.
311. Luukinen H, Jokelainen J, Kervinen K, Kesaniemi YA, Winqvist S, Hillbom M. Risk of dementia associated with the ApoE epsilon4 allele and falls causing head injury without explicit traumatic brain injury. Acta Neurol Scand 2008; 118:153-8.
312. Ost M, Nylen K, Csajbok L, Blennow K, Rosengren L, Nellgard B. Apolipoprotein E polymorphism and gender difference in outcome after severe traumatic brain injury. Acta Anaesthesiol Scand 2008; 52:1364-9.
313. Rapoport M, Wolf U, Herrmann N, Kiss A, Shammi P, Reis M, Phillips A, Feinstein A. Traumatic brain injury, Apolipoprotein E-epsilon4, and cognition in older adults: a two-year longitudinal study. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 2008; 20:68-73.
314. Kristman VL, Tator CH, Kreiger N, Richards D, Mainwaring L, Jaglal S, Tomlinson G, Comper P. Does the apolipoprotein epsilon 4 allele predispose varsity athletes to concussion? A prospective cohort study. Clin J Sport Med 2008; 18:322-8.

315. Han SD, Suzuki H, Drake AI, Jak AJ, Houston WS, Bondi MW. Clinical, cognitive, and genetic predictors of change in job status following traumatic brain injury in a military population. J Head Trauma Rehabil 2009; 24:57-64.
316. Hiekkanen H, Kurki T, Brandstack N, Kairisto V, Tenovuo O. Association of injury severity, MRI-results and ApoE genotype with 1-year outcome in mainly mild TBI: a preliminary study. Brain Inj 2009; 23:396-402.
317. Lo TY, Jones PA, Chambers IR, Beattie TF, Forsyth R, Mendelow AD, Minns RA. Modulating effect of apolipoprotein E polymorphisms on secondary brain insult and outcome after childhood brain trauma. Childs Nerv Syst 2009; 25:47-54.
318. Jiang Y, Sun X, Gui L, Xia Y, Tang W, Cao Y, Gu Y. Correlation between APOE -491AA promoter in epsilon4 carriers and clinical deterioration in early stage of traumatic brain injury. J Neurotrauma 2007; 24:1802-10.
319. Jiang Y, Sun XC, Gui L, Tang WY, Zhen LP, Gu YJ, Wu HT. Lack of association between apolipoprotein E promoters in epsilon4 carriers and worsening on computed tomography in early stage of traumatic brain injury. Acta Neurochir Suppl 2008; 105:233-6.
320. Terrell TR, Bostick RM, Abramson R, Xie D, Barfield W, Cantu R, Stanek M, Ewing T. APOE, APOE promoter, and Tau genotypes and risk for concussion in college athletes. Clin J Sport Med 2008; 18:10-7.
321. Uzan M, Tanriverdi T, Baykara O, Kafadar A, Sanus GZ, Tureci E, Ozkara C, Uysal O, Buyra N. Association between interleukin-1 beta (IL-1beta) gene polymorphism and outcome after head injury: an early report. Acta Neurochir (Wien) 2005; 147:715-20.
322. Hadjigeorgiou GM, Paterakis K, Dardiotis E, Dardioti M, Aggelakis K, Tasiou A, Xiromerisiou G, Komnos A, Zintzaras E, Scarmeas N, Papadimitriou A, Karantanas A. IL-1RN and IL-1B gene polymorphisms and cerebral hemorrhagic events after traumatic brain injury. Neurology 2005; 65:1077-82.
323. Dardiotis E, Dardioti M, Hadjigeorgiou GM, Paterakis K. Re: Lack of association between the IL1A gene (-889) polymorphism and outcome after head injury. Tanriverdi T et al. Surg Neurol 2006;65:7-10; discussion 10. Surg Neurol 2006; 66:334-5.
324. Chan F, Lanctot KL, Feinstein A, Herrmann N, Strauss J, Sicard T, Kennedy JL, McCullagh S, Rapoport MJ. The serotonin transporter polymorphisms and major depression following traumatic brain injury. Brain Inj 2008; 22:471-9.
325. 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; 270:13757-65.
326. Mora M, Carinci V, Bensi G, Raugei G, Buonamassa DT, Melli M. Differential expression of the human IL-1 alpha and beta genes. Prog Clin Biol Res 1990; 349:205-16.
327. 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; 152:223-31.
328. 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; 74:177-84.
329. Watanabe N, Kobayashi Y. Selective release of a processed form of interleukin 1 alpha. Cytokine 1994; 6:597-601.
330. 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 propiece. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:7245-9.
331. 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; 82:1204-8.
332. Brody DT, Durum SK. Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. J Immunol 1989; 143:1183-7.
333. 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; 6:535-9.
334. Grutter MG, van Oostrum J, Priestle JP, Edelmann E, Joss U, Feige U, Vosbeck K, Schmitz A. 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; 7:663-71.

335. 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; 9:1503-10.
336. 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; 140:2267-73.
337. 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; 269:23141-9.
338. 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; 213:243-9.
339. Jobling SA, Auron PE, Gurka G, Webb AC, McDonald B, Rosenwasser LJ, Gehrke L. Biological activity and receptor binding of human prointerleukin-1 beta and subpeptides. J Biol Chem 1988; 263:16372-8.
340. 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; 138:4249-55.
341. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, et al. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. Science 1988; 241:585-9.
342. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, et al. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. Embo J 1991; 10:2821-32.
343. Sims JE, Painter SL, Gow IR. Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors. Cytokine 1995; 7:483-90.
344. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1984; 81:7907-11.
345. Furutani Y, Notake M, Fukui T, Ohue M, Nomura H, Yamada M, Nakamura S. Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. Nucleic Acids Res 1986; 14:3167-79.
346. Amick JE, Yandora KA, Bell MJ, Wisniewski SR, Adelson PD, Carcillo JA, Janesko KL, DeKosky ST, Carlos TM, Clark RS, Kochanek PM. The Th1 versus Th2 cytokine profile in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. Pediatr Crit Care Med 2001; 2:260-264.
347. Lafage M, Maroc N, Dubreuil P, de Waal Malefijt R, Pebusque MJ, Carcassonne Y, Mannoni P. The human interleukin-1 alpha gene is located on the long arm of chromosome 2 at band q13. Blood 1989; 73:104-7.
348. 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; 1:491-7.
349. 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; 83:1670-4.
350. Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1. Int J Biochem Cell Biol 1998; 30:1075-9.
351. 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; 47:195-8.
352. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF, Jr., Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature 2000; 404:398-402.
353. Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TW, Breedveld FC, Seymour AB. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. Arthritis Rheum 2004; 50:1976-83.
354. Licastro F, Chiappelli M, Caldarera CM, Tampieri C, Nanni S, Gallina M, Branzi A. 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; 125:575-9.

355. Nishimura M, Kawakami H, Komure O, Maruyama H, Morino H, Izumi Y, Nakamura S, Kaji R, Kuno S. Contribution of the interleukin-1beta gene polymorphism in multiple system atrophy. Mov Disord 2002; 17:808-11.
356. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. Curr Opin Crit Care 2002; 8:101-5.
357. 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; 39:400-2.
358. 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; 284:73-6.
359. 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; 118:155-63.
360. Zanardini R, Bocchio-Chiavetto L, Scassellati C, Bonvicini C, Tura GB, Rossi G, Perez J, Gennarelli M. Association between IL-1beta -511C/T and IL-1RA (86bp)n repeats polymorphisms and schizophrenia. J Psychiatr Res 2003; 37:457-62.
361. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. Transplantation 2001; 72:1444-50.
362. Nemetz A, Nosti-Escanilla MP, Molnar T, Kope A, Kovacs A, Feher J, Tulassay Z, Nagy F, Garcia-Gonzalez MA, Pena AS. IL1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease. Immunogenetics 1999; 49:527-31.
363. Parks CG, Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, Pandey JP. 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; 63:91-4.
364. Muraki Y, Tsutsumi A, Takahashi R, Suzuki E, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, Noguchi E, Sumida T. Polymorphisms of IL-1 beta gene in Japanese patients with Sjogren’s syndrome and systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2004; 31:720-5.
365. Virta M, Hurme M, Helminen M. Increased frequency of interleukin-1beta (-511) allele 2 in febrile seizures. Pediatr Neurol 2002; 26:192-5.
366. 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; 47:571-4.
367. 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; 326:70-2.
368. McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Association of interleukin-1 beta polymorphisms with idiopathic Parkinson’s disease. Neurosci Lett 2002; 326:67-9.
369. Endler G, Marsik C, Joukhadar C, Marculescu R, Mayr F, Mannhalter C, Wagner OF, Jilma B. The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism does not determine plasma interleukin-6 concentrations in experimental endotoxemia in humans. Clin Chem 2004; 50:195-200.
370. 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; 38:221-8.
371. 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; 79:1864-9.
372. 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; 11:251-5.
373. 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.

374. 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; 42:860-4.
375. Hutyrova B, Pantelidis P, Drabek J, Zurkova M, Kolek V, Lenhart K, Welsh KI, Du Bois RM, Petrek M. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165:148-51.
376. Ravindran JS, Owen P, Lagan A, Lewis J, Korendowych E, Welsh K, McHugh N. Interleukin 1alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor gene polymorphisms in psoriatic arthritis. Rheumatology (Oxford) 2004; 43:22-6.
377. Sciacca FL, Ferri C, Veglia F, Andreetta F, Mantegazza R, Cornelio F, Franciotta D, Piccolo G, Cosi V, Batocchi AP, Evoli A, Grimaldi LM. IL-1 genes in myasthenia gravis: IL-1A -889 polymorphism associated with sex and age of disease onset. J Neuroimmunol 2002; 122:94-9.
378. Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LM, Biunno I. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. Immunogenetics 2002; 54:82-6.
379. Um JY, Moon KS, Lee KM, Yun JM, Cho KH, Moon BS, Kim HM. Association of interleukin-1 alpha gene polymorphism with cerebral infarction. Brain Res Mol Brain Res 2003; 115:50-4.
380. 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; 31:81-4.
381. Combarros O, Infante J, Llorca J, Berciano J. Interleukin-1A (-889) genetic polymorphism increases the risk of multiple system atrophy. Mov Disord 2003; 18:1385-6.
382. Plata-Salaman CR, Ffrench-Mullen JM. Interleukin-1 beta depresses calcium currents in CA1 hippocampal neurons at pathophysiological concentrations. Brain Res Bull 1992; 29:221-3.
383. Tsuda H, Huang RW, Takatsuki K. Interleukin-2 prevents programmed cell death in adult T-cell leukemia cells. Jpn J Cancer Res 1993; 84:431-7.
384. 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.
385. 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; 58:593-8.
386. Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. Brain Res 1992; 587:250-6.
387. 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; 56:636-43.
388. 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; 18:1292-303.
389. 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.
390. Ohsuzu F. The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. J Atheroscler Thromb 2004; 11:313-21.
391. 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; 138:951-60.
392. Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. Circ Res 2001; 88:877-87.
393. 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; 97:242-4.
394. Isoda K, Shiigai M, Ishigami N, Matsuki T, Horai R, Nishikawa K, Kusuhara M, Nishida Y, Iwakura Y, Ohsuzu F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. Circulation 2003; 108:516-8.

395. 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; 99:6280-5.
396. Isoda K, Sawada S, Ishigami N, Matsuki T, Miyazaki K, Kusuhara M, Iwakura Y, Ohsuzu F. Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24:1068-73.
397. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23:656-60.
398. 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; 110:1678-85.
399. 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; 191:303-12.
400. Esmon CT. Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 1999; 12:343-59.
401. 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; 160:618-23.
402. Schorer AE, White JG. Interleukin 1 enhances arterial thrombogenicity in vitro. Thromb Res 1989; 56:515-22.
403. 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; 8:822-7.
404. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13:323-40.
405. 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; 161:2004-10.
406. Muzio M, Polentarutti N, Sironi M, Poli G, De Gioia L, Introna M, Mantovani A, Colotta F. Cloning and characterization of a new isoform of the interleukin 1 receptor antagonist. J Exp Med 1995; 182:623-8.
407. 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.
408. Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. J Clin Invest 1997; 99:2930-40.
409. Greenfeder SA, Varnell T, Powers G, Lombard-Gillooly K, Shuster D, McIntyre KW, Ryan DE, Levin W, Madison V, Ju G. 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; 270:22460-6.
410. Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, Duff GW. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. Hum Genet 1993; 91:403-4.
411. 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; 99:303-10.
412. Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:2394-400.
413. Robb RJ, Munck A, Smith KA. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. J Exp Med 1981; 154:1455-74.
414. Nelson BH, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. Adv Immunol 1998; 70:1-81.
415. Rickert M, Boulanger MJ, Goriatcheva N, Garcia KC. Compensatory energetic mechanisms mediating the assembly of signaling complexes between interleukin-2 and its alpha, beta, and gamma(c) receptors. J Mol Biol 2004; 339:1115-28.
416. Wang X, Rickert M, Garcia KC. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gammac receptors. Science 2005; 310:1159-63.

417. Nelson BH, Lord JD, Greenberg PD. Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. Nature 1994; 369:333-6.
418. Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, Kawamura M, Bacon CM, Friedmann M, Berg M, McVicar DW, Witthuhn BA, Silvennoinen O, et al. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. Science 1994; 266:1042-5.
419. Zmuidzinas A, Mamon HJ, Roberts TM, Smith KA. Interleukin-2-triggered Raf-1 expression, phosphorylation, and associated kinase activity increase through G1 and S in CD3-stimulated primary human T cells. Mol Cell Biol 1991; 11:2794-803.
420. Moon JJ, Rubio ED, Martino A, Krumm A, Nelson BH. A permissive role for phosphatidylinositol 3-kinase in the Stat5-mediated expression of cyclin D2 by the interleukin-2 receptor. J Biol Chem 2004; 279:5520-7.
421. Moriggl R, Topham DJ, Teglund S, Sexl V, McKay C, Wang D, Hoffmeyer A, van Deursen J, Sangster MY, Bunting KD, Grosveld GC, Ihle JN. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. Immunity 1999; 10:249-59.
422. Crabtree GR. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. Science 1989; 243:355-61.
423. Gesbert F, Moreau JL, Theze J. IL-2 responsiveness of CD4 and CD8 lymphocytes: further investigations with human IL-2Rbeta transgenic mice. Int Immunol 2005; 17:1093-102.
424. Malek TR. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. J Leukoc Biol 2003; 74:961-5.
425. Maloy KJ, Powrie F. Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ Treg cells fit. Nat Immunol 2005; 6:1071-2.
426. Schimpl A, Berberich I, Kneitz B, Kramer S, Santner-Nanan B, Wagner S, Wolf M, Hunig T. IL-2 and autoimmune disease. Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13:369-78.
427. Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. Cytokine 2004; 28:109-23.
428. Wang H, Diamond RA, Yang-Snyder JA, Rothenberg EV. Precocious expression of T cell functional response genes in vivo in primitive thymocytes before T lineage commitment. Int Immunol 1998; 10:1623-35.
429. Yang-Snyder JA, Rothenberg EV. Developmental and anatomical patterns of IL-2 gene expression in vivo in the murine thymus. Dev Immunol 1993; 3:85-102.
430. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. Cell 1993; 75:253-61.
431. Reya T, Bassiri H, Biancaniello R, Carding SR. Thymic stromal-cell abnormalities and dysregulated T-cell development in IL-2-deficient mice. Dev Immunol 1998; 5:287-302.
432. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, Noelle RJ, Horak I. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. Eur J Immunol 1995; 25:3053-9.
433. Kneitz B, Herrmann T, Yonehara S, Schimpl A. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. Eur J Immunol 1995; 25:2572-7.
434. Petitto JM, Streit WJ, Huang Z, Butfiloski E, Schiffenbauer J. Interleukin-2 gene deletion produces a robust reduction in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. Neurosci Lett 2000; 285:66-70.
435. Radford-Smith G, Jewell DP. Cytokines and inflammatory bowel disease. Baillieres Clin Gastroenterol 1996; 10:151-64.
436. Pawlik A, Kurzawski M, Florczak M, Gawronska Szklarz B, Herczynska M. IL1beta+3953 exon 5 and IL-2 -330 promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 2005; 23:159-64.
437. Eerligh P, Koeleman BP, Dudbridge F, Jan Bruining G, Roep BO, Giphart MJ. Functional genetic polymorphisms in cytokines and metabolic genes as additional genetic markers for susceptibility to develop type 1 diabetes. Genes Immun 2004; 5:36-40.
438. Crispin JC, Alcocer-Varela J. Interleukin-2 and systemic lupus erythematosus--fifteen years later. Lupus 1998; 7:214-22.

439. Niinuma A, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Gejyo F, Tanaka N, Sugamura K, Xie L, Green PL, Fujii M. Aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop through the nuclear factor of activated T cells by nonleukemogenic human T-cell leukemia virus type 2 but not by leukemogenic type 1 virus. J Virol 2005; 79:11925-34.
440. Kochanek PM, Clark RS, Ruppel RA, Adelson PD, Bell MJ, Whalen MJ, Robertson CL, Satchell MA, Seidberg NA, Marion DW, Jenkins LW. Biochemical, cellular, and molecular mechanisms in the evolution of secondary damage after severe traumatic brain injury in infants and children: Lessons learned from the bedside. Pediatr Crit Care Med 2000; 1:4-19.
441. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. Science 1988; 240:1169-76.
442. Hanisch UK, Quirion R. Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine. Brain Res Brain Res Rev 1995; 21:246-84.
443. Su HC, Cousens LP, Fast LD, Slifka MK, Bungiro RD, Ahmed R, Biron CA. CD4+ and CD8+ T cell interactions in IFN-gamma and IL-4 responses to viral infections: requirements for IL-2. J Immunol 1998; 160:5007-17.
444. Truettner JS, Suzuki T, Dietrich WD. The effect of therapeutic hypothermia on the expression of inflammatory response genes following moderate traumatic brain injury in the rat. Brain Res Mol Brain Res 2005; 138:124-34.
445. Jensen MA, Arnason BG, Toscas A, Noronha A. Global inhibition of IL-2 and IFN-gamma secreting T cells precedes recovery from acute monophasic experimental autoimmune encephalomyelitis. J Autoimmun 1996; 9:587-97.
446. Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, Mohler KM. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. J Immunol 1992; 149:2496-505.
447. Gallo P, Piccinno M, Pagni S, Tavolato B. Interleukin-2 levels in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. Ann Neurol 1988; 24:795-7.
448. Merrill JE. Interleukin-2 effects in the central nervous system. Ann N Y Acad Sci 1990; 594:188-99.
449. Degrave W, Tavernier J, Duerinck F, Plaetinck G, Devos R, Fiers W. Cloning and structure of the human interleukin 2 chromosomal gene. Embo J 1983; 2:2349-53.
450. Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. Curr Opin Immunol 1995; 7:333-42.
451. Brabletz T, Pietrowski I, Serfling E. The immunosuppressives FK 506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin 2 enhancer. Nucleic Acids Res 1991; 19:61-7.
452. Secrist JP, Karnitz L, Abraham RT. T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. J Biol Chem 1991; 266:12135-9.
453. Weiss A, Koretzky G, Schatzman RC, Kadlecek T. Functional activation of the T-cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88:5484-8.
454. Downward J, Graves J, Cantrell D. The regulation and function of p21ras in T cells. Immunol Today 1992; 13:89-92.
455. Izquierdo Pastor M, Reif K, Cantrell D. The regulation and function of p21ras during T-cell activation and growth. Immunol Today 1995; 16:159-64.
456. Kronke M, Leonard J, Depper M, Greene W. Structure and function of the human interleukin 2 receptor gene. Behring Inst Mitt 1987:60-72.
457. Gaffen SL. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. Cytokine 2001; 14:63-77.
458. John S, Turner D, Donn R, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, Hutchinson IV, Hajeer AH. Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. Eur J Immunogenet 1998; 25:419-20.
459. Matesanz F, Delgado C, Fresno M, Alcina A. Allelic selection of human IL-2 gene. Eur J Immunol 2000; 30:3516-21.
460. Reynard MP, Turner D, Navarrete CV. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. Eur J Immunogenet 2000; 27:241-9.

461. Matesanz F, Fedetz M, Collado-Romero M, Fernandez O, Guerrero M, Delgado C, Alcina A. Allelic expression and interleukin-2 polymorphisms in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2001; 119:101-5.
462. Togawa S, Joh T, Itoh M, Katsuda N, Ito H, Matsuo K, Tajima K, Hamajima N. Interleukin-2 gene polymorphisms associated with increased risk of gastric atrophy from Helicobacter pylori infection. Helicobacter 2005; 10:172-8.
463. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2002; 29:587-91.
464. MacMillan ML, Radloff GA, Kiffmeyer WR, DeFor TE, Weisdorf DJ, Davies SM. High-producer interleukin-2 genotype increases risk for acute graft-versus-host disease after unrelated donor bone marrow transplantation. Transplantation 2003; 76:1758-62.
465. Fedetz M, Matesanz F, Caliz R, Ferrer MA, Collado MD, Alcina A, Martin J. Lack of association between -384 and 114 IL-2 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2003; 30:435-7.
466. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. Blood 1995; 86:1243-54.
467. Richards CD, Gauldie J. *The acute-phase protein response. Textbook of Immunopharmacology*: Eds M. M. Dale, J. C. Foreman and T. P. Fan Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994.
468. Hirano T, Matsuda T, Nakajima K. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. Stem Cells 1994; 12:262-77.
469. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. Annu Rev Immunol 1995; 13:369-98.
470. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. Cell 1994; 76:253-62.
471. Heaney ML, Golde DW. Soluble cytokine receptors. Blood 1996; 87:847-57.
472. Mackiewicz A, Wiznerowicz M, Roeb E, Karczewska A, Nowak J, Heinrich PC, Rose-John S. Soluble interleukin 6 receptor is biologically active in vivo. Cytokine 1995; 7:142-9.
473. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. Biochem J 1994; 300 (Pt 2):281-90.
474. Gadient RA, Otten U. Differential expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat hypothalamus. Neurosci Lett 1993; 153:13-16.
475. Gadient RA, Otten U. Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. Brain Res 1994; 637:10-4.
476. Gadient RA, Otten U. Identification of interleukin-6 (IL-6)-expressing neurons in the cerebellum and hippocampus of normal adult rats. Neurosci Lett 1994; 182:243-6.
477. Schobitz B, Voorhuis DA, De Kloet ER. Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. Neurosci Lett 1992; 136:189-92.
478. Schobitz B, de Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. Eur J Neurosci 1993; 5:1426-35.
479. Ringheim GE, Burgher KL, Heroux JA. Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain. J Neuroimmunol 1995; 63:113-23.
480. Labourdette GaS, M. *Growth factors and their receptors in the central nervous system. In: Neuroglia*, 1995.
481. Norris JG, Tang LP, Sparacio SM, Benveniste EN. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. J Immunol 1994; 152:841-50.
482. Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T. TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. Brain Res 1992; 583:296-9.
483. Wesselingh SL, Gough NM, Finlay-Jones JJ, McDonald PJ. Detection of cytokine mRNA in astrocyte cultures using the polymerase chain reaction. Lymphokine Res 1990; 9:177-85.
484. Benveniste EN, Sparacio SM, Norris JG, Grenett HE, Fuller GM. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. J Neuroimmunol 1990; 30:201-12.

485. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. J Immunol 1993; 150:2659-67.
486. Gitter BD, Regoli D, Howbert JJ, Glasebrook AL, Waters DC. Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. J Neuroimmunol 1994; 51:101-8.
487. Gottschall PE, Tatsuno I, Arimura A. Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). Brain Res 1994; 637:197-203.
488. Grimaldi M, Pozzoli G, Navarra P, Preziosi P, Schettini G. Vasoactive intestinal peptide and forskolin stimulate interleukin 6 production by rat cortical astrocytes in culture via a cyclic AMP-dependent, prostaglandin-independent mechanism. J Neurochem 1994; 63:344-50.
489. Norris JG, Benveniste EN. Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine. J Neuroimmunol 1993; 45:137-45.
490. Righi M, Mori L, De Libero G, Sironi M, Biondi A, Mantovani A, Donini SD, Ricciardi-Castagnoli P. Monokine production by microglial cell clones. Eur J Immunol 1989; 19:1443-8.
491. Sebire G, Emilie D, Wallon C, Hery C, Devergne O, Delfraissy JF, Galanaud P, Tardieu M. In vitro production of IL-6, IL-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha by human embryonic microglial and neural cells. J Immunol 1993; 150:1517-23.
492. Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C, Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. Neurosci Lett 1989; 104:340-4.
493. Hama T, Kushima Y, Miyamoto M, Kubota M, Takei N, Hatanaka H. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. Neuroscience 1991; 40:445-52.
494. Kushima Y, Hatanaka H. Interleukin-6 and leukemia inhibitory factor promote the survival of acetylcholinesterase-positive neurons in culture from embryonic rat spinal cord. Neurosci Lett 1992; 143:110-4.
495. Yamada M, Hatanaka H. Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. Brain Res 1994; 643:173-80.
496. Qiu Z, Parsons KL, Gruol DL. Interleukin-6 selectively enhances the intracellular calcium response to NMDA in developing CNS neurons. J Neurosci 1995; 15:6688-99.
497. Holliday J, Parsons K, Curry J, Lee SY, Gruol DL. Cerebellar granule neurons develop elevated calcium responses when treated with interleukin-6 in culture. Brain Res 1995; 673:141-8.
498. Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Kaziro Y. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. Mol Cell Biol 1988; 8:3546-9.
499. Marz P, Herget T, Lang E, Otten U, Rose-John S. Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. Eur J Neurosci 1997; 9:2765-73.
500. Sterneck E, Kaplan DR, Johnson PF. Interleukin-6 induces expression of peripherin and cooperates with Trk receptor signaling to promote neuronal differentiation in PC12 cells. J Neurochem 1996; 67:1365-74.
501. Wu YY, Bradshaw RA. Synergistic induction of neurite outgrowth by nerve growth factor or epidermal growth factor and interleukin-6 in PC12 cells. J Biol Chem 1996; 271:13033-9.
502. Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. J Immunol 1990; 144:129-35.
503. Chiang CS, Stalder A, Samimi A, Campbell IL. Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. Dev Neurosci 1994; 16:212-21.
504. Fattori E, Lazzaro D, Musiani P, Modesti A, Alonzi T, Ciliberto G. IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrocytosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. Eur J Neurosci 1995; 7:2441-9.
505. Steffensen SC, Campbell IL, Henriksen SJ. Site-specific hippocampal pathophysiology due to cerebral overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. Brain Res 1994; 652:149-53.

506. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. Eur J Immunol 1989; 19:689-94.
507. Schobitz B, De Kloet ER, Holsboer F. Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain. Prog Neurobiol 1994; 44:397-432.
508. Oka T, Oka K, Hosoi M, Hori T. Intracerebroventricular injection of interleukin-6 induces thermal hyperalgesia in rats. Brain Res 1995; 692:123-8.
509. Sehgal PB. Regulation of IL6 gene expression. Res Immunol 1992; 143:724-34.
510. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:10193-7.
511. Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Hashimoto S, Natsuka S, Kishimoto T. A nuclear factor for the IL-6 gene (NF-IL6). Chem Immunol 1992; 51:299-322.
512. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest 1998; 102:1369-76.
513. Bennermo M, Held C, Stemme S, Ericsson CG, Silveira A, Green F, Tornvall P. Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: implications for a variety of major diseases? Clin Chem 2004; 50:2136-40.
514. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. J Biol Chem 2000; 275:18138-44.
515. Zheng C, Huang DR, Bergenbrant S, Sundblad A, Osterborg A, Bjorkholm M, Holm G, Yi Q. Interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma. Br J Haematol 2000; 109:39-45.
516. Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. Eur J Immunogenet 1998; 25:267.
517. Bennet AM, Prince JA, Fei GZ, Lyrenas L, Huang Y, Wiman B, Frostegard J, Faire U. Interleukin-6 serum levels and genotypes influence the risk for myocardial infarction. Atherosclerosis 2003; 171:359-67.
518. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, Lowe GD, Humphries SE. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:1458-63.
519. Cox ED, Hoffmann SC, DiMercurio BS, Wesley RA, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. Transplantation 2001; 72:720-6.
520. Meenagh A, Williams F, Ross OA, Patterson C, Gorodezky C, Hammond M, Leheny WA, Middleton D. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. Hum Immunol 2002; 63:1055-61.
521. Hassan MI, Aschner Y, Manning CH, Xu J, Aschner JL. Racial differences in selected cytokine allelic and genotypic frequencies among healthy, pregnant women in North Carolina. Cytokine 2003; 21:10-6.
522. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? Diabetes 2005; 54 Suppl 2:S114-24.
523. Greisenegger S, Endler G, Haering D, Schillinger M, Lang W, Lalouschek W, Mannhalter C. The (-174) G/C polymorphism in the interleukin-6 gene is associated with the severity of acute cerebrovascular events. Thromb Res 2003; 110:181-6.
524. Rauramaa R, Vaisanen SB, Luong LA, Schmidt-Trucksass A, Penttila IM, Bouchard C, Toyry J, Humphries SE. Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:2657-62.
525. Burzotta F, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Glieca F, Luciani N, Zamparelli R, Schiavello R, Donati MB, Maseri A, Possati G, Andreotti F. Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. Am J Cardiol 2001; 88:1125-8.

526. Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:1334-9.
527. Hefler LA, Grimm C, Ackermann S, Malur S, Radjabi-Rahat AR, Leodolter S, Beckmann MW, Zeillinger R, Koelbl H, Tempfer CB. An interleukin-6 gene promoter polymorphism influences the biological phenotype of ovarian cancer. Cancer Res 2003; 63:3066-8.
528. Foster CB, Lehrnbecher T, Samuels S, Stein S, Mol F, Metcalf JA, Wyvill K, Steinberg SM, Kovacs J, Blauvelt A, Yarchoan R, Chanock SJ. An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. Blood 2000; 96:2562-7.
529. Cozen W, Gill PS, Ingles SA, Masood R, Martinez-Maza O, Cockburn MG, Gauderman WJ, Pike MC, Bernstein L, Nathwani BN, Salam MT, Danley KL, Wang W, Gage J, Gundell-Miller S, Mack TM. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. Blood 2004; 103:3216-21.
530. Jones KG, Brull DJ, Brown LC, Sian M, Greenhalgh RM, Humphries SE, Powell JT. Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. Circulation 2001; 103:2260-5.
531. Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J, Capella G, Canzian F. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. Cancer Res 2003; 63:3560-6.
532. Sambrook, Fritsch, Μανιάτης. Molecular cloning, A Laboratory Manual. Second Edition ed. Vol Book 2: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
533. 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; 106:220-7.
534. Campos MI, Godoy dos Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants. Implant Dent 2005; 14:391-6.
535. Rothwell N. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. Brain Behav Immun 2003; 17:152-7.
536. Carter DB, Deibel MR, Jr., Dunn CJ, Tomich CS, Laborde AL, Slightom JL, Berger AE, Bienkowski MJ, Sun FF, McEwan RN, et al. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. Nature 1990; 344:633-8.
537. Haskill S, Martin G, Van Le L, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe GJ, Hammerberg C, Sporn SA, Fong S, et al. cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88:3681-5.
538. Worrall BB, Azhar S, Nyquist PA, Ackerman RH, Hamm TL, DeGraba TJ. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in carotid atherosclerosis. Stroke 2003; 34:790-3.
539. Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris P, Carter ND, Jeffery S, Kaski JC, Cumberland DC, Duff GW, Crossman DC. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. Circulation 1999; 99:861-6.
540. Kastrati A, Koch W, Berger PB, Mehilli J, Stephenson K, Neumann FJ, von Beckerath N, Bottiger C, Duff GW, Schomig A. Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. J Am Coll Cardiol 2000; 36:2168-73.
541. Francis SE, Camp NJ, Burton AJ, Dewberry RM, Gunn J, Stephens-Lloyd A, Cumberland DC, Gershlick A, Crossman DC. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and restenosis after coronary angioplasty. Heart 2001; 86:336-40.
542. McClain CJ, Cohen D, Ott L, Dinarello CA, Young B. Ventricular fluid interleukin-1 activity in patients with head injury. J Lab Clin Med 1987; 110:48-54.
543. Rothwell NJ. Sixteenth Gaddum Memorial Lecture December 1996. Neuroimmune interactions: the role of cytokines. Br J Pharmacol 1997; 121:841-7.
544. Tehranian R, Andell-Jonsson S, Beni SM, Yatsiv I, Shohami E, Bartfai T, Lundkvist J, Iverfeldt K. 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; 19:939-51.

545. Yang GY, Zhao YJ, Davidson BL, Betz AL. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the mouse brain reduces ischemic brain injury. Brain Res 1997; 751:181-8.

546. Yang GY, Mao Y, Zhou LF, Ye W, Liu XH, Gong C, Lorris Betz A. Attenuation of temporary focal cerebral ischemic injury in the mouse following transfection with interleukin-1 receptor antagonist. Brain Res Mol Brain Res 1999; 72:129-37.

547. Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Neugebauer E, Marino MW, McIntosh TK. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:8721-6.

548. Rothwell NJ, Strijbos PJ. Cytokines in neurodegeneration and repair. Int J Dev Neurosci 1995; 13:179-85.

549. Spranger M, Lindholm D, Bandtlow C, Heumann R, Gnahn H, Naher-Noe M, Thoenen H. Regulation of Nerve Growth Factor (NGF) Synthesis in the Rat Central Nervous System: Comparison between the Effects of Interleukin-1 and Various Growth Factors in Astrocyte Cultures and in vivo. Eur J Neurosci 1990; 2:69-76.

550. DeKosky ST, Goss JR, Miller PD, Styren SD, Kochanek PM, Marion D. Upregulation of nerve growth factor following cortical trauma. Exp Neurol 1994; 130:173-7.

551. DeKosky ST, Styren SD, O’Malley ME, Goss JR, Kochanek P, Marion D, Evans CH, Robbins PD. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses neurotrophin response in injured rat brain. Ann Neurol 1996; 39:123-7.

552. Carlson NG, Wieggel WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. J Immunol 1999; 163:3963-8.

553. Ide CF, Scripter JL, Coltman BW, Dotson RS, Snyder DC, Jelaso A. Cellular and molecular correlates to plasticity during recovery from injury in the developing mammalian brain. Prog Brain Res 1996; 108:365-77.

554. Scripter JL, Ko J, Kow K, Arimura A, Ide CF. Regulation by interleukin-1beta of formation of a line of delimiting astrocytes following prenatal trauma to the brain of the mouse. Exp Neurol 1997; 145:329-41.

555. Appel E, Kolman O, Kazimirsky G, Blumberg PM, Brodie C. Regulation of GDNF expression in cultured astrocytes by inflammatory stimuli. Neuroreport 1997; 8:3309-12.

556. Bizette C, Chan-Chi-Song P, Fontaine M, Tadie M. [Expression of mRNA, interleukin-1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha during regeneration of the sciatic nerve in rats after tissue loss]. Chirurgie 1996; 121:474-81.

557. Wang J, Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Oldfield EH. Intrastriatal implantation of interleukin-1. Reduction of parkinsonism in rats by enhancing neuronal sprouting from residual dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the midbrain. J Neurosurg 1994; 80:484-90.

558. Schneider H, Pitossi F, Balschun D, Wagner A, del Rey A, Besedovsky HO. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:7778-83.

559. Penkowa M, Giralt M, Carrasco J, Hadberg H, Hidalgo J. Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. Glia 2000; 32:271-85.

560. Chiaretti A, Antonelli A, Mastrangelo A, Pezzotti P, Tortorolo L, Tosi F, Genovese O. Interleukin-6 and nerve growth factor upregulation correlates with improved outcome in children with severe traumatic brain injury. J Neurotrauma 2008; 25:225-34.

561. Alderson P, Roberts I. Corticosteroids for acute traumatic brain injury. Cochrane Database Syst Rev 2005:CD000196.

562. Hurley LH, Von Hoff DD, Siddiqui-Jain A, Yang D. Drug targeting of the c-MYC promoter to repress gene expression via a G-quadruplex silencer element. Semin Oncol 2006; 33:498-512.

563. Bonetta L. RNA-based therapeutics: ready for delivery? Cell 2009; 136:581-4.

564. Cacabelos R. Pharmacogenomics in Alzheimer’s disease. Methods Mol Biol 2008; 448:213-357.