



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: ACE tag SNPs σε ασθενείς με κρανιοεγκεφαλική κάκωση

Σιώκας Π. Βασίλειος
Ιατρός

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Δαρδιώτης Ευθύμιος, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας, Επιβλέπων
- Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Καθηγητής Νευρολογίας
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ιατρική-Νευρογενετική

Λάρισα, Οκτώβριος, 2014



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
ACE tag SNPs in patients with traumatic brain injury

By
Siokas P. Vasileios

Three-member committee:

- Dardiotis Efthimios, Assistant Professor of Neurology, Supervisor
- Hadjigeorgiou Georgios, Professor of Neurology
- Germanis Anastasios, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Medicine-Neurogenetics

Larisa, October, 2014

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
ΚΡΑΝΙΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΚΑΚΩΣΗ (ΚΕΚ).....	12
Γενικά για τις κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις	12
Ο μηχανισμός της εγκεφαλικής κάκωσης	12
Η εγκεφαλική θλάση	13
Η εγκεφαλική διάσειση	13
Τα κατάγματα του κρανίου.....	14
Οι βλάβες των κρανιακών νεύρων	15
Οι επιληπτικές κρίσεις ως συνέπεια της ΚΕΚ	15
Το οξύ επισκληρίδιο αιμάτωμα	16
Το υποσκληρίδιο αιμάτωμα (οξύ, υποξύ και χρόνια)	16
Η υπαραχνοειδής αιμορραγία	17
Η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία	17
Κλίμακες εκτίμησης ασθενών με ΚΕΚ	18
Προγνωστικοί παράγοντες κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης.....	21
Επιβαρυντικοί παράγοντες πριν την ΚΕΚ.....	21
Παθοφυσιολογία της ΚΕΚ	24
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΚΡΑΝΙΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ	31
Η γενετική βάση της ΚΕΚ.....	31
Το γονίδιο ACE	39
Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE).....	41
SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs).....	45
Γενικά.....	45
Ο νόμος Hardy-Weinberg.....	46
Ισορροπία και ανισορροπία γενετικής σύνδεσης.....	47
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
ΣΚΟΠΟΣ.....	49
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
Ασθενείς	49
Επιλογή πολυμορφισμών.....	51
Εργαστηριακές τεχνικές	52
Στατιστική ανάλυση.....	60

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ.Δαρδιώτη Ευθύμιο, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας, για την επίβλεψη, την καθοδήγηση και την βοήθεια του στην εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας. Επίσης τον Δρ.Χατζηγεωργίου Γεώργιο, Καθηγητή Νευρολογίας για την προσωπική του μέριμνα και την ουσιαστική βοήθειά του για την ολοκλήρωση της εν λόγω εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Δρ.Δαρδιώτη Μαρία, βιοχημικό, για την πολυποίκιλη βοήθειά της και τη στήριξη της στο εργαστήριο Νευρογενετικής στην Ειδική Μονάδα Νευροεπιστημών. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ.Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας και διευθυντή του Π.Μ.Σ., για την ευκαιρία που μου έδωσε μέσω της συμμετοχής μου σε αυτό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η έκβαση μετά από κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις (ΚΕΚ) διαμορφώνονται, σε κάποιο βαθμό, από γενετικές παραλλαγές. Οι γνωστοί παράγοντες κινδύνου δεν μπορούν να εξηγήσουν πλήρως την έκβαση μιας ΚΕΚ, με πολλές μελέτες να εστιάζουν στην εμπλοκή γενετικών παραγόντων στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ και μάλιστα φαίνεται πως η βλάβη στον εγκέφαλο μετά από ΚΕΚ και η έκβαση αυτής να επηρεάζεται από γενετικούς πολυμορφισμούς. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει πιθανή συσχέτιση πολυμορφισμών (rs4343, rs4461142, rs7221780, rs8066276, και rs8066114) του γονιδίου του ACE με την έκβαση ασθενών που είχαν υποστεί ΚΕΚ καθώς και την μακροπρόθεσμη κλινική έκβαση αυτών μετά από ΚΕΚ.

Μέθοδος: Συνολικά 363 ασθενείς με ΚΕΚ συμμετείχαν στο μελέτη, με αρχική εκτίμηση της κλινικής τους εικόνας με τη Κλίμακα Γλασκώβης (GCS). Η επανεκτίμηση των ασθενών έγινε με την Κλίμακα έκβασης Γλασκώβης (GOS) μετά από έξι μήνες. Με βάση τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ως προς τον τύπο της αιμορραγίας. Η απομόνωση του DNA έγινε με τη μέθοδο της εξαλάτωσης και η ταυτοποίηση των γονοτύπων των πολυμορφισμών έγινε με γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman. Το Fischer exact test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ισορροπίας Hardy-Weinberg και η σύγκριση των διάφορων μεταβλητών έγινε με τη μέθοδο του χ^2 . Ο έλεγχος των επιδράσεων των αλληλομόρφων και των απλοτύπων ως προς την έκβαση της ΚΕΚ (GOS-μετά από 6 μήνες), πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή διαφόρων υποθετικών μοντέλων κληρονόμησης και τη χρήση ειδικών στατιστικών προγραμμάτων, μετά από προσαρμογή ως προς το φύλο, την ηλικία, την GCS.

Αποτελέσματα: Στη πολυπαραγοντική ανάλυση, η ηλικία [OR: 1,09, 95% C.I. (0,106 έως 0,12), $p < 0,001$] και η GCS εισόδου [OR: 0,56, 95% C.I. (0,48 έως 0,65), $p < 0,001$], αλλά όχι το φύλο σχετίζονταν σημαντικά με την GOS μετά από 6 μήνες. Επιπλέον, δύο SNPs βρέθηκαν να επηρεάζουν την έκβαση της ΚΕΚ: ο rs7221780 και ο rs8066276. Ακόμη εφτά απλότυποι (TTCCG, CCTC, CTCC, TCTC, TTCC, CCCC, CTCG) οι οποίοι προήλθαν από τους πολυμορφισμούς rs4461142 C/T, rs7221780 T/C, rs8066276 C/T, rs8066114 C/G, ελέγχθηκαν για πιθανή συσχέτιση με ευνοϊκή ή δυσμενή έκβαση ασθενών με ΚΕΚ χωρίς όμως να προκύπτει τέτοια συσχέτιση.

Συμπεράσματα: Υπάρχουν ενδείξεις λοιπόν συμμετοχής του γονιδίου ACE στην κλινική έκβαση των ασθενών μετά από ΚΕΚ. Από τη μελέτη μας δύο SNPs βρέθηκαν να επηρεάζουν την έκβαση των ασθενών με ΚΕΚ: ο rs7221780 και ο rs8066276. Η εύρεση του λειτουργικού πολυμορφισμού του γονιδίου του ACE που ρυθμίζει τα επίπεδα του ACE στο πλάσμα, θα μπορούσε να έχει αντίκτυπο στη φαρμακογενωμική καθώς οι αναστολείς του ACE χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. Επιπλέον μελέτες σε πιο μεγάλα δείγματα ασθενών και

μάλιστα διαφορετικών εθνικοτήτων, καθώς και σε άλλα γονίδια και πολυμορφισμούς θα πρέπει να πραγματοποιηθούν, ώστε να έχουμε μία πιο σαφή εικόνα για την γενετική των ασθενών ΚΕΚ με στόχο ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

Λέξεις κλειδιά:

- κρανιοεγκεφαλική κάκωση
- κλίμακα έκβασης Γλασκώβης
- μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης
- πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου
- μέθοδος Taqman
- νόμος Hardy-Weinberg
- ανισορροπία γενετικής σύνδεσης

ABSTRACT

Introduction: Many studies show that outcome after traumatic brain injury (TBI) is shaped to some extent by genetic variations. The known risk factors cannot fully explain the outcome of TBI, with many studies focusing on the involvement of genetic factors in the pathophysiology of TBI and indeed brain damage after TBI and the outcome of it seems to be influenced by genetic polymorphisms. The purpose of this study was to investigate the possible association of polymorphisms (rs4343, rs4461142, rs7221780, rs8066276, and rs8066114) of the ACE gene on the outcome of patients who suffered TBI and long-term clinical outcome after TBI.

Method: A total of 363 patients with TBI participated in the study, with an initial assessment of their clinical picture with Glasgow Coma Scale (GCS). The reevaluation of the patients was performed using the Glasgow Outcome Scale (GOS) after six months. Based on the findings of computed tomography patients were categorized by the type of bleeding. The isolation of DNA was materialized with the method of salting-out and the identification of polymorphisms of genotypes was made using the genotyping TaqMan method. The Fischer exact test was used to control the Hardy-Weinberg equilibrium and comparison of the various variables was made by the method of χ^2 . The control of the effects of alleles and haplotypes in the outcome of TBI (GOS-after six months) was performed with the implementation of various hypothetical models of inheritance and the use of specific statistical programs, after adjustment to gender, age the GCS.

Results: In the multivariate analysis, age [OR: 1.09, 95% CI (0.06 to 0.12), $p < 0.001$] and GCS at admission [OR: 0.56, 95% CI (0.48 to 0.65), $p < 0.001$], but not sex significantly associated with GOS after 6 months. In addition, two SNPs were found to affect the outcome of TBI: the rs7221780 and rs8066276. Furthermore seven haplotypes (TTCG, CCTC, CTCC, TCTC, TTCC, CCCC, CTCG), which were generated by the polymorphisms rs4461142 C/T, rs7221780 T/C, rs8066276 C/T, rs8066114 C/G, were tested for possible association with good or poor outcome in patients with TBI, without showing such correlation.

Conclusions: So there is evidence of involvement of ACE gene in the clinical outcome of patients after TBI. From our study two SNPs were found to influence the outcome of patients with TBI: the rs7221780 and rs8066276. Finding the functional polymorphism of the ACE gene that regulates ACE levels in plasma, could have an impact on pharmacogenomics, as ACE inhibitors are already used in clinical practice. Further studies in larger patient samples and even in different nationalities, as well as with other genes and polymorphisms must be performed in order to have a clearer picture of the genetic of patients with TBI, aiming to the development of new therapeutic strategies.

Keywords:

- traumatic brain injury
- Glasgow outcome scale
- angiotensin converting enzyme
- single nucleotide polymorphism
- Taqman method
- Hardy-Weinberg principle
- linkage disequilibrium

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και πιο ξεκάθαρη η γενετική συμβολή στη πρόγνωση, στην έκβαση ακόμη και στη θεραπεία διαφόρων νοσημάτων, μεταξύ αυτών και νευρολογικά νοσήματα. Οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις φαίνεται πως επηρεάζονται σε κάποιο βαθμό και αυτές από το γενετικό υπόβαθρο και πληθώρα γονιδίων έχουν μελετηθεί σε διεθνές επίπεδο για συσχετίσεις διαφόρων παραγόντων με αυτή. Λόγω της πολυπλοκότητας της παθοφυσιολογίας, ολόένα και περισσότερες νευρογενετικές μελέτες, διεξάγονται, στοχεύοντας στην κατανόηση πολύπλοκων γενετικών μονοπατιών, με απώτερο στόχο τη θεραπεία και την προαγωγή της υγείας.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετήσει πιθανή συσχέτιση tag SNPs του γονιδίου του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, (ACE:angiotensin converting enzyme) με την έκβαση των ασθενών μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Παρόλο που, ο ακριβής μηχανισμός επίδρασης του ACE πολυμορφισμού στην έκβαση μετά από ΚΕΚ παραμένει άγνωστος, η παρούσα μελέτη στηρίχθηκε στη υπόθεση πως η διαταραχή της ροής του αίματος στον εγκέφαλο και/ή η αυτορρύθμιση της πίεσης του αίματος πιθανό να επηρεάζουν την σύσπαση των εγκεφαλικών αγγείων και την εγκεφαλική βλάβη μετά από ισχαιμία, πως η αναστολή της συσσώρευση Αβ αμυλοειδούς και την επακόλουθη κυτταροτοξικότητα, και ακόμη στο ρόλο του ACE στη φλεγμονή και στην ανάπτυξη του εγκεφαλικού οιδήματος.

Συλλέχθηκαν 363 ασθενείς από το τμήμα επειγόντων της Νευροχειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Η αρχική εκτίμηση της κλινικής τους εικόνας έγινε με τη Κλίμακα Γλασκώβης (GCS). Η επανεκτίμηση τους έγινε με την Κλίμακα έκβασης Γλασκώβης (GOS) μετά από έξι μήνες. Με βάση τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας έγινε η κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση τον τύπο της αιμορραγίας. Μετά την απομόνωση του DNA έγινε, ταυτοποίηση των γονοτύπων των πολυμορφισμών έγινε με γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman και εν συνεχεία έλεγχος για συσχέτιση τόσο των SNPs όσο και απλοτύπων που δημιουργήθηκαν από αυτά.

Η εργασία είναι χωρισμένη σε γενικό και σε ειδικό μέρος. Στο γενικό μέρος, και στο πρώτο μέρος αυτού, παρουσιάζονται κάποια γενικά στοιχεία για τις κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις (όπως μορφές αυτής, προγνωστικοί δείκτες, παθοφυσιολογία). Στη συνέχεια γίνεται μία συνοπτική παρουσίαση της γενετικής βάσης της ΚΕΚ και αναλυτικότερη περιγραφή του γονιδίου του ACE. Επίσης παρουσιάζονται κάποιες βασικές έννοιες για τα SNPs.

Στο ειδικό μέρος, περιγράφεται η μέθοδος, τα υλικά, η επιλογή και η καταγραφή των ασθενών και των πολυμορφισμών, οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν και η στατιστική ανάλυση. Τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η συζήτηση γύρω από τα αποτελέσματα και από όλο το θέμα.

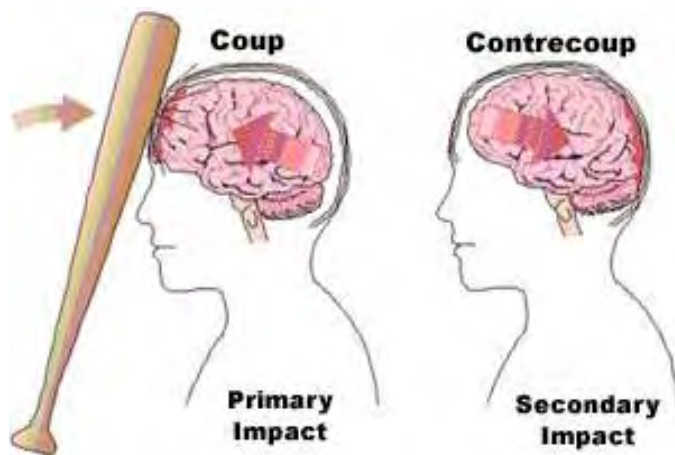
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΡΑΝΙΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΚΑΚΩΣΗ (ΚΕΚ)

Γενικά για τις κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις

Η κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ) είναι μία από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας και αναπηρία σε όλο τον κόσμο, ιδιαίτερα μεταξύ των νέων ατόμων σε παραγωγικά χρόνια τους ζωής. Παρά τις προόδους στη διαχείριση των ΚΕΚ, υπάρχει μεγάλη διακύμανση στο κλινικό αποτέλεσμα μετά από μία ΚΕΚ, με αποτέλεσμα, περισσότερο από το 40% των νοσηλευόμενων που επιζούν, να έχουν κάποιο είδος μακροχρόνιας αναπηρίας [1]. Όπως ήδη αναφέραμε, το εγκεφαλικό τραύμα αποτελεί διεθνώς ένα σοβαρό πρόβλημα υγείας και η ΚΕΚ κατέχει υψηλή θέση σε συχνότητα και βαρύτητα μεταξύ των άλλων νευρολογικών νοσημάτων. Περίπου 35.000 ασθενείς ετησίως εισάγονται σε νοσοκομεία στη Ελλάδα, με σοβαρές ΚΕΚ και 1.600 από αυτούς πεθαίνουν. Οι αιτίες της ΚΕΚ ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία. Στις ηλικίες 15-30 επικρατούν τα τροχαία ενώ στις μικρές και στις μεγάλες ηλικίες κύρια αιτία είναι η πτώση.

Οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις μπορεί να είναι είτε ανοικτές, συνήθως μετά από πυροβολισμό, είτε κλειστές (γνωστές και ως μη διατιτραίνουσες), η οποίες είναι και οι πλέον συχνές που συμβαίνουν στην καθημερινή ζωή. Οι κακώσεις διακρίνονται επίσης στις coup και countercoup με βάση το θέση της βλάβης και τη θέση του σημείου πρόσκρουσης (εικόνα 1). Στις coup η βλάβη εντοπίζεται στο σημείο της πρόσκρουσης, ενώ αντίθετα στις countercoup αυτή εντοπίζεται αντιδιαμετρικά από το σημείο της πρόσκρουσης [2].



Εικόνα 1. Στην εικόνα φαίνεται ο μηχανισμός κάκωσης coup (αριστερά) και contrecoup (δεξιά). Η βλάβη στην coup εντοπίζεται στο σημείο της πρόσκρουσης, ενώ αντίθετα στις contrecoup αυτή εντοπίζεται αντιδιαμετρικά από το σημείο της πρόσκρουσης.

Ο μηχανισμός της εγκεφαλικής κάκωσης

Μεταξύ των λειτουργιών του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ), είναι και η άμβλυνση των πιέσεων που ασκούνται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) κατά τις μηχανικές κακώσεις, παρεμποδίζοντας έτσι την σύνθλιψη του εγκεφάλου. Το ΕΝΥ προφυλάσσει τον εγκέφαλο και από εσωτερικές πιέσεις, όπως αυτές που προέρχονται από ώσεις της καρδιάς, παρεμποδίζοντας

την «σύνθλιψη» του εγκεφάλου από τη σκληρά μήνιγγα [219]. Ουσιαστικά ο εγκέφαλος επιπλέει μέσα στο ΕΝΥ, με αποτέλεσμα να μπορεί να κινείται χωριστά από το κρανίο. Με αυτό τον τρόπο, όταν ασκηθεί στην κεφαλή ένα έντονο και γρήγορο χτύπημα, αυτή τίθεται σε κίνηση ενώ η κίνηση του εγκεφάλου καθυστερεί. Με ανάλογο τρόπο, όταν το κεφάλι κινείται με κάποια ταχύτητα και χτυπήσει σε ένα ακίνητο αντικείμενο, αυτό σταματάει απότομα, ο εγκέφαλος όμως αντιθέτως όχι. Αξίζει να σημειωθεί, πως λόγω της μικρότερης δυνατότητας για κίνηση του στελέχους του εγκεφάλου, που βρίσκεται στον οπίσθιο κρανιακό βόθρο κάτω από το σκηνίδιο της παρεγκεφαλίδας, σε σχέση με τα ημισφαίρια, αυτό παθαίνει μεγαλύτερη παραμόρφωση σε σχέση με τα ημισφαίρια και μάλιστα στο επίπεδο του άνω δικτυωτού σχηματισμού.

Η εγκεφαλική θλάση

Η εγκεφαλική θλάση αποτελεί νευρολογική βλάβη η οποία όμως είναι εστιακή και συνέπεια μώλωπα που δημιουργείται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα Η πετεχειακή αιμορραγία ποικίλου βαθμού, τον οίδημα καθώς και η ιστική καταστροφή συνιστούν την εγκεφαλική θλάση. Ο μηχανισμός πρόκλησης αυτών είναι ο εξής: μετακίνηση των εγκεφαλικών ημισφαιρίων λόγω μηχανικών δυνάμεων σε σχέση με το κρανίο, όπως συμβαίνει και στις εν τω βάθει αιμορραγίες [4]. Στις εγκεφαλικές θλάσεις, οι επιφανειακές εγκεφαλικές έλικες προσκρούουν στην εσωτερική επιφάνεια του κρανίου ή στις αναδιπλώσεις της σκληράς μήνιγγας και μπορεί να τραυματιστούν με συνέπεια coup ή contrecoup θλάσεις, αιμορραγίες ή διασχίσεις του νευρικού ιστού. Η θλάση μπορεί να συμβεί και μακριά από το σημείο πλήξης, με αποτέλεσμα ρήξη των αξόνων των νευρικών ινών όπως στη λευκή ουσία των ημισφαιρίων (αξονότμηση τύπου I), στο μεσολόβιο (αξονότμηση τύπου II) ή στο στέλεχος (αξονότμηση τύπου III) [3]. Τέλος αιμορραγία του εγκεφαλικού ιστού μπορεί να συμβεί είτε από βλήμα υψηλής ταχύτητας είτε από συμπίεση του εγκεφάλου μεταξύ δύο επιφανειών που συγκλίνουν, χωρίς μετακίνηση του κρανίου ή του εγκεφάλου.

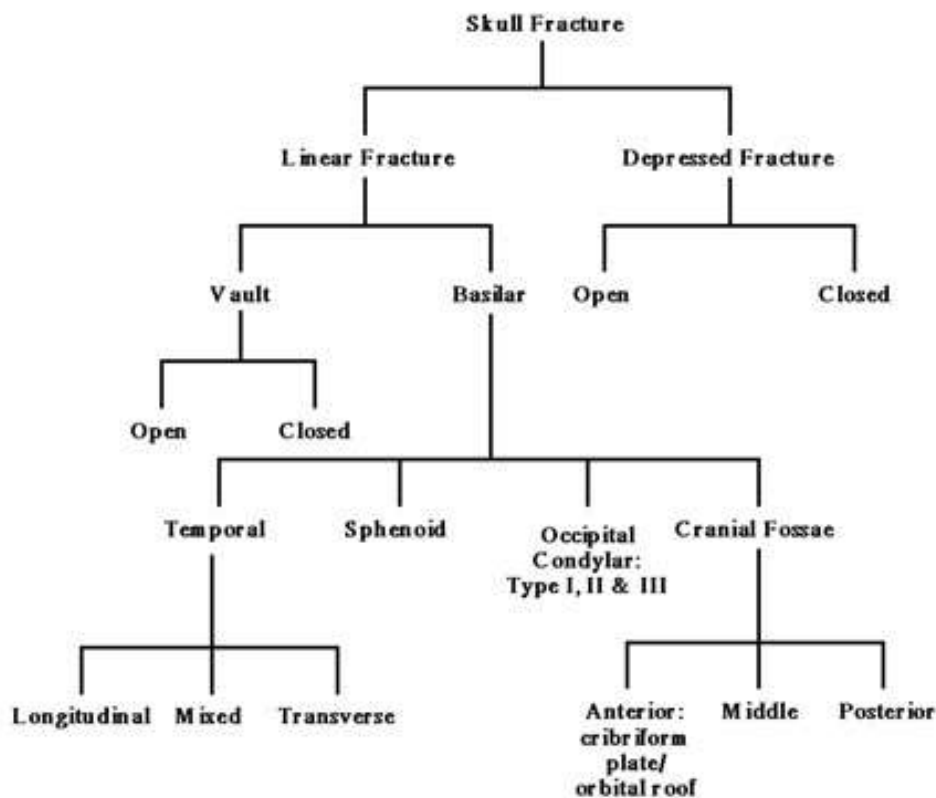
Η εγκεφαλική διάσειση

Είναι η άμεση αλλά παροδική απώλεια της συνείδησης η οποία συνδυάζεται με περίοδο αμνησίας, η οποία όμως είναι βραχείας διάρκειας και οι ασθενείς είναι ζαλισμένοι ή βλέπουν αστράκια και ο μηχανισμός πρόκλησης είναι τυπικά η αιφνίδια μετατόπιση του εγκεφάλου μέσα στο κρανίο που ακολουθεί μετά από μία απότομη μετωπιαία σύγκρουση. Είναι δηλαδή, μία παροδική εγκεφαλική βλάβη, που λαμβάνει χώρα όταν υπάρχει βίαιο χτύπημα ή τράνταγμα του εγκεφάλου, με συνέπεια αυτής είναι η παροδική απώλεια των αισθήσεων. Ο μηχανισμός της απώλειας συνείδησης στη διάσειση πιστεύεται ότι οφείλεται σε ηλεκτροφυσιολογική δυσλειτουργία του ενεργοποιητικού δικτυωτού σχηματισμού στον ανώτερο μεσεγκέφαλο που

είναι παροδική και που προκαλείται από στροφή των εγκεφαλικών ημισφαιρίων στο σχετικά σταθερό εγκεφαλικό στέλεχος [4]. Παθοφυσιολογικά δηλαδή πιστεύεται πως υπάρχει παροδική διαταραχή της μεμβράνης των νευρώνων του δικτυωτού σχηματισμού [5].

Τα κατάγματα του κρανίου

Η ελαστική αντοχή των οστών προστατεύει από τα κατάγματα του κρανίου όση περίπτωση όμως άσκησης μεγάλης και βίαιης δύναμης, αυτή μπορεί να υπερνικηθεί και να προκληθεί κατάγματα του κρανίου [4]. Όταν αυτά είναι παρόντα σε μία ΚΕΚ, τότε αυξάνεται η πιθανότητα εκδήλωσης επιπλοκών όπως είναι η εμφάνιση αιματώματος, ενώ διαγνωστικά συνεισφέρουν στην εντόπιση της ΚΕΚ και στη εκτίμηση της βαρύτητας της κάκωσης. Παρόλα αυτά ακόμη και χωρίς κάταγμα του κρανίου μπορεί να υπάρχει διάσειση και θλάση. Τα κατάγματα του κρανίου ταξινομούνται σε αυτά του θόλου του κρανίου και σε αυτά της βάσης του κρανίου [220].



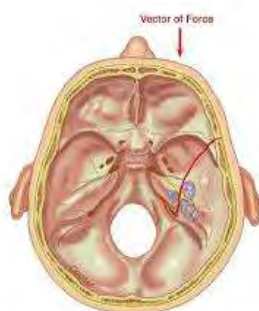
Εικόνα 2. Ταξινόμηση των καταγμάτων του κρανίου [220].

Τα κατάγματα της βάσης του κρανίου συνήθως είναι επιπλεγμένα και μπορεί να εμφανιστεί αιμοτύμπανο, περικογχική εκχύμωση (σημείο ρακούν) ή εκχύμωση γύρω από την μαστοειδή απόφυση, οπισθοωτιαία (σημείο Battle) (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Αριστερά σημείο ρακούν, όπου ο ασθενής παρουσιάζει οι εκχυμώσεις περικογχικά άμφω και δεξιά σημείο Battle όπου παρατηρούνται με μώλωπες στην οπισθοωτιαία περιοχή του ασθενούς.

Εμφανίζονται είτε ανεξάρτητα, είτε ως επέκταση καταγμάτων του θόλου του κρανίου. Χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή γιατί ανάλογα με την εντόπιση και την έκταση τους μπορεί να έχουν διάφορες συνέπειες όπως νευροενδοκρινικές διαταραχές, βλάβη διαφόρων εγκεφαλικών συζυγιών και κλάδων αυτών (όπως π.χ. οπτικό, απαγωγό, προσωπικό, ρήξη των οσφρητικών ινών) καθώς και είσοδος αέρα ή/και μικροβίων στον εγκέφαλο, ή η εκροή ENY από τους παραρρίνιους κόλπους (ρινόρροια) και τον έξω ακουστικό πόρο (ωτόρροια), βλάβη των ακουστικών οσταρίων και τραυματισμό του έξω ακουστικού πόρου.



Εικόνα 4. Κάταγμα λιθοειδούς οστού. Δεξιά κάτω απεικονίζεται η γραμμή του κατάγματος, ενώ πάνω και δεξιά φαίνεται η φορά της δύναμης που ασκήθηκε στο κρανίο και σημειώνετε με βέλος. Μπορεί να προσκαλέσουν πάρεση του προσωπικού νεύρου, ωτόρροια ENY και διάρρηξη των οσταρίων, τραυματισμό του έξω ακουστικού πόρου.

Οι βλάβες των κρανιακών νεύρων

Το οσφρητικό, το οπτικό, τα οφθαλμοκινητικά, ο πρώτος και ο δεύτερος κλάδος του τριδύμου, το προσωπικό και το ακουστικό κυρίως, μπορεί να τραυματίστούν στις ΚΕΚ και να υπάρξει ανάλογη συμπτωματολογία [4].

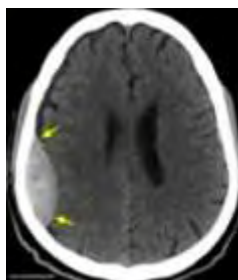
Οι επιληπτικές κρίσεις ως συνέπεια της ΚΕΚ

Τονικές εστιακές αντιδράσεις στα άκρα βραχείας διάρκειας ή λίγες κλονικές κινήσεις, σπάνια μπορεί να εμφανιστούν αμέσως μετά από την κάκωση. Μετά από πάροδο ετών επιληπτικές κρίσεις μπορεί να εμφανιστούν, αν υπάρξουν όμως φλοιϊκές ουλές από θλάσεις [4]. Η

καθυστερημένη εμφάνιση των επιληπτικών κρίσεων μπορεί να εκδηλωθεί σε ποσοστό 10-40% των ασθενών με εγκεφαλικές θλάσεις [241, 242].

Το οξύ επισκληρίδιο αιμάτωμα

Πρόκειται για συλλογή αίματος μεταξύ της σκληράς μήνιγγας του εγκεφάλου και της έσω κάψας του κρανίου και αποτελεί βαριά επιπλοκή των ΚΕΚ. Η ρήξη της μέσης μηνιγγικής αρτηρίας λόγω κατάγματος του κροταφικού ή βρεγματικού οστού αποτελεί την κύρια αιτία αυτού. Άλλες αιτίες είναι η ρήξη της μέσης μηνιγγικής φλέβας, του φλεβώδους κόλπου ή αιμορραγία από τη διπλόη. Το φωτεινό διάλλειμα αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό του επισκληρίδιου αιματώματος και αποτελεί μία περίοδο ελεύθερη συμπτωμάτων που μεσολαβεί από τον τραυματισμό του ασθενούς μέχρι να εμφανιστούν είτε τα συμπτώματα είτε να διαπιστωθεί η ύπαρξη κλινικών-νευρολογικών σημείων. Επειδή η εξέλιξη του αιματώματος μπορεί να είναι θανατηφόρα, οι ασθενείς πρέπει να βρίσκονται κάτω από συνεχή και εντατική παρακολούθηση και φροντίδα, για τυχόν παρερμηνεία της κλινικής εικόνας [5]. Ο ασθενής καθίσταται ημιπληγικός και κωματώδης καθώς μεγαλώνει το αιμάτωμα. Το φακοειδούς σχήματος αιμάτωμα (εικόνα 5), με λεία έσω επιφάνεια στη αξονική τομογραφία θέτει τη διάγνωση.

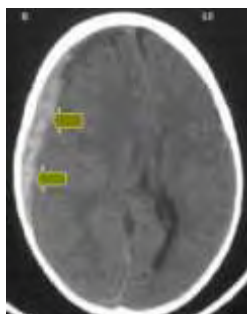


Εικόνα 5. CT ασθενούς με επισκληρίδιο αιμάτωμα. Χαρακτηριστικό είναι το φακοειδές σχήμα αυτού με την λεία έσω επιφάνεια, όπως φαίνεται ανάμεσα στα βέλη.

Το υποσκληρίδιο αιμάτωμα (οξύ, υποξύ και χρόνιο)

Η συλλογή αίματος μεταξύ της σκληράς μήνιγγας και των λεπτών μηνίγγων του κρανίου αποτελεί το υποσκληρίδιο αιμάτωμα και η αιτία του είναι η ρήξη φλεβών που συνδέουν την περιοχή ανάμεσα στον εγκέφαλο και στη σκληρά μήνιγγα [5]. Στο οξύ που προέρχεται από εγκεφαλική θλάση εμφανίζεται άμεσα, το υποξύ είναι παρόμοιας κλινικής εικόνας αλλά με πιο βραδεία εξέλιξη και το χρόνιο αποτελεί καθυστερημένη επιπλοκή μετά από βδομάδες ή και μήνες. Παρόλο που πιο συχνά το κώμα εμφανίζεται αμέσως και επιδεινώνεται προοδευτικά, υπάρχει ενίοτε (όχι όμως πάντα) ένα σύντομο «φωτεινό» διάλειμμα, είτε το αιμάτωμα είναι αμφοτερόπλευρο, είτε ετερόπλευρο. Στο ετερόπλευρο και μεγάλο αιμάτωμα υπάρχει παρεκτόπιση της επίφυσης και συμπίεση της πλάγιας κοιλίας, ενώ στο αμφοτερόπλευρο που δεν υπάρχει παρεκτόπιση, το κοιλιακό σύστημα να εμφανίζεται συμμετρικό απεικονιστικά. Ενώ τα

επισκληρίδια αιματώματα συνεχώς διογκώνονται, τα υποσκληρίδια μπορεί να πέσουν σε χρονιότητα, λόγω της αύξησης της ενδοκράνιας πίεσης που σταματά την υποσκληρίδια αιμορραγία. Στη αξονική τομογραφία το αιμάτωμα είναι υπέρπυκνο και εν συνεχεία υπόπυκνο, και στις περιπτώσεις που δεν υπάρχει παρεκτόπιση του εγκεφάλου, αυτό προκαλεί δυσχέρεια στη διάγνωση.



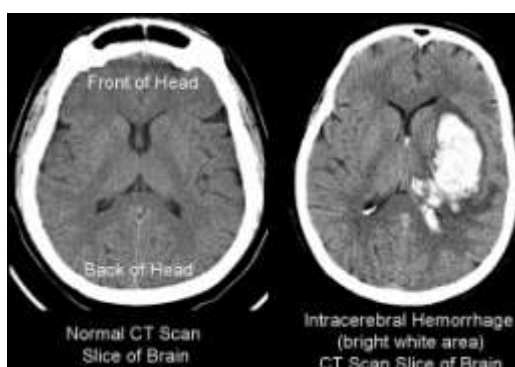
Εικόνα 6. CT ασθενούς με υποσκληρίδιο αιμάτωμα

Η υπαραχνοειδής αιμορραγία

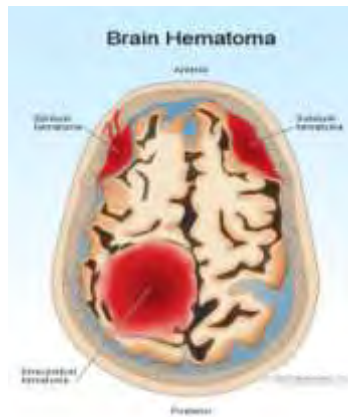
Όταν υπάρχει ρήξη αγγείων μέσα στον υπαραχνοειδή χώρο, έχουμε υπαραχνοειδή αιμορραγία, η οποία απεικονίζεται εύκολα στην αξονική τομογραφία. Κλινικά παρουσιάζεται αυχενική δυσκαμψιά με διαταραχή του επιπέδου συνείδησης και εστιακή νευρολογική σημειολογία, η οποία ποικίλλει.

Η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία

Σε αντίθεση με την υπαραχνοειδή αιμορραγία που εντοπίζεται στον υπαραχνοειδή χώρο, η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία εντοπίζεται μέσα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα και προκαλείται από ρήξη τροφικών αγγείων ή μεγαλύτερων αγγειακών κλάδων.



Εικόνα 7. CT φυσιολογικού ατόμου (αριστερά) και ασθενούς με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (δεξιά), η οποία αντιστοιχεί στη φωτεινή λευκή περιοχή μέσα στον εγκεφαλικό παρέγχυμα.



Εικόνα 8. Στη εικόνα παρουσιάζονται συγκριτικά τα αιματώματα (επισκληρίδιο, υποσκληρίδιο και ενδοεγκεφαλικό. Το επισκληρίδιο αιμάτωμα (πάνω αριστερά), το υποσκληρίδιο αιμάτωμα (πάνω δεξιά) και το ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα (κάτω).

Κλίμακες εκτίμησης ασθενών με ΚΕΚ

Η κλίμακα Γλασκώβης (GCS:Glasgow Coma Scale)

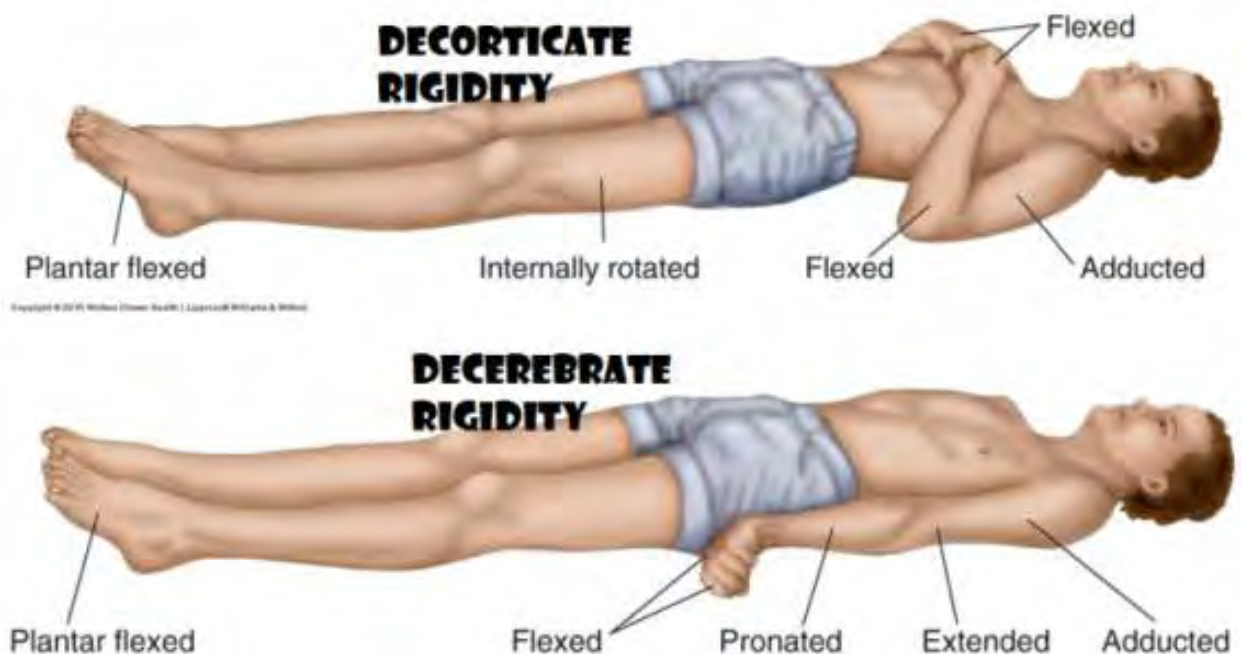
Ένα πρακτικό μέσο για την εκτίμηση του επιπέδου συνείδησης του ασθενούς ανά τακτά χρονικά διαστήματα είναι η κλίμακα κώματος της Γλασκώβης (GCS: Glasgow Coma Scale) (πίνακας 1) χωρίς όμως να υποκαθιστά την πλήρη νευρολογική εξέταση. Πρόκειται για μία κλίμακα, με την οποία εκτιμάται η ικανότητα του ασθενούς να εκτελέσει τρεις 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 είναι από 3 έως 15. Και σχετίζονται και με την παρακολούθηση της κλινικής πορείας των ασθενών, καθώς και με την έκβαση μετά από βαριά κάκωση (GCS<8: σχετίζεται με κακή πρόγνωση), ενώ η σταδιακή μείωση της αποτελεί ένδειξη για τροποποίηση της αντιμετώπισης του ασθενούς.

Πίνακας 1. Κλίμακα Γλασκώβης (GCS)

Ανοιγμα ματιών	Αυθόρμητα= 4 Σε πρόσταγμα = 3 Σε πόνο = 2 Καμία αντίδραση = 1
Αντίδραση στο λόγο	Προσανατολισμένος = 5 Συγκεχυμένος = 4 (κατανοητός λόγος αλλά για άσχετα θέματα) Μόνο λέξεις, φωνές = 3 (ασύνδετη ομιλία χωρίς νόημα, σκόρπιες λέξεις, βρισιές) Ήχοι, βογκητά = 2 Καμία αντίδραση = 1
Κινητική αντίδραση	Ακολουθεί παραγγελίες = 6 Εντοπίζει τον πόνο= 5 Κάμψη σε πόνο (απόσυρση κανονική) = 4 Κάμψη αποφλοιώσης στον πόνο = 3 Έκταση απεγκεφαλισμού στον πόνο = 2 Καμία αντίδραση = 1



Εικόνα 9. Κάμψη αποφλοιώσης (πάνω) όπου βλέπουμε κάμψη στα άνω άκρα (αγκώνες και καρποί), και έκταση και κάτω και κάμψη απεγκεφαλισμού (κάτω) όπου φαίνεται η έκταση και ο πρηγισμός στα άνω άκρα και η έσω στροφή και η πελματιαία κάμψη στα κάτω άκρα. Η δυσκαμψία μπορεί να αυξάνει με αλγινό ερέθισμα και μπορεί να φθάσει σε οπισθότονο [212].

Κλίμακα ανώτερων λειτουργιών (RANCHO/USA)

Μία άλλη κλίμακα η οποία βοηθά για την εκτίμηση του ασθενούς είναι η κλίμακα ανώτερων λειτουργιών (RANCHO/USA) και παρουσιάζεται στον πίνακα 2 [5].

Πίνακας 2. Κλίμακα ανώτερων λειτουργιών (RANCHO/USA)

ΕΠΙΠΕΔΟ I

Έλλειψη απάντησης στον πόνο, στην αφή, στον ήχο ή στο οπτικό ερέθισμα.

ΕΠΙΠΕΔΟ II

Γενικευμένη αντανακλαστική απάντηση στον πόνο.

ΕΠΙΠΕΔΟ III

Εντοπισμένη απάντηση. Σύσφιγξη βλεφάρων στην πρόπτωση ισχυρού φωτός, στροφή κεφαλής υπό το κράτος ακουστικού ερεθίσματος, απάντηση επί δυσανεξίας συνέπεια φυσικών παραμέτρων (θερμοκρασίας, ψύχους κλπ.) μη συγκεκριμένη απάντηση στις εντολές.

ΕΠΙΠΕΔΟ IV

Ο ασθενής είναι συγκεκριμένος ή διεγερτικός. Είναι κινητοποιημένος, έντονα κινητικός, επιθετικός ή εκφράζει παράδοση συμπεριφορά, εκδηλώνει κινητικές δραστηριότητες αλλά η συμπεριφορά του δεν είναι σκόπιμη και η προσοχή είναι εξαιρετικώς βραχεία: πολύ περιορισμένη προσοχή.

ΕΠΙΠΕΔΟ V

Ο ασθενής είναι συγκεκριμένος αλλά όχι διεγερτικός. Επιδεικνύει αδρά προσοχή προς το περιβάλλον, η οποία διασπάται πολύ εύκολα, χρειάζεται συνεχή επαναφορά στο αντικείμενο της προσοχής του, δυσκολία στην εκμάθηση νέων καθηκόντων, κινητοποιείται από πολύ ισχυρές διεγέρσεις. Μπορεί να εμπλακεί σε συζήτηση με το κοινωνικό περιβάλλον, αλλά δεν συζητεί επί συγκεκριμένου θέματος.

ΕΠΙΠΕΔΟ VI

Συγκεκριμένος αλλά με αρμόζουσα συμπεριφορά, αποπροσανατολισμένος ως προς το χρόνο, τόπο. Η πρόσφατη μνήμη είναι διαταραγμένη και η μνημονική εγχάραξη των λόγων βραχεία. Ανακαλεί παλαιές μνημονικές εγχαράξεις, μπορεί να συνεργαστεί σε απλά παραγγέλματα και μπορεί η συμπεριφορά του να καταστεί σκόπιμη μετά από βοήθεια.

ΕΠΙΠΕΔΟ VII

Ο ασθενής παρουσιάζει αυτοματισμούς αλλά η συμπεριφορά του είναι κατάλληλη, μπορεί να επιτελέσει καθημερινές εργασίες μέσα στο οικογενειακό του περιβάλλον κατά μη συγκεκριμένο τρόπο υπό μορφή αυτοματικών επαναλήψεων. Η επιδεξιότητά του επιδεινώνεται όταν βρεθεί σε μη οικείο περιβάλλον. Στερείται πραγματιστικού προγραμματισμού για το μέλλον.

ΕΠΙΠΕΔΟ VIII

Σκόπιμη και κατάλληλη συμπεριφορά.

Προγνωστικοί παράγοντες κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης

Κλίμακα έκβασης Γλασκώβης (GOS)

Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας-αντιμετώπισης ασθενούς μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση χρησιμοποιείται συχνότερα η κλίμακα έκβασης της Γλασκώβης. Η GOS παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3) και συμπεριλαμβάνει το θάνατο, την παρατεταμένη φυτική κατάσταση, τη σοβαρή ανικανότητα (όταν δηλαδή ο ασθενής εξαρτάται από τους άλλους για τις δραστηριότητες της καθημερινής ζωής), τη μέτρια ανικανότητα (όταν ο ασθενής είναι ανεξάρτητος στις καθημερινές δραστηριότητες) και την πλήρη ανάρρωση (ο ασθενής επανέρχεται στην εργασία του). Σε μια μελέτη η όπου πραγματοποιήθηκε επιθετική χειρουργική σε ασθενείς που ήταν κωματώδεις κατά την εισαγωγή θεραπεία, προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: θνητότητα: 32%, σοβαρή ανικανότητα/φυτική κατάσταση: 11%, μέτρια ανικανότητα/πλήρης ανάρρωση: 57% [6].

Πίνακας 3. Κλίμακα έκβαση Γλασκώβης (GOS)

Πλήρης ανάρρωση (G): Επάνοδος στις φυσιολογικές δραστηριότητες αν και ίσως να υπάρχουν σωματικά και ψυχικά 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)

Επιβαρυντικοί παράγοντες πριν την ΚΕΚ

Υπάρχει πολλοί επιβαρυντικοί παράγοντες πριν την κάκωση και επηρεάζουν την πρόγνωση του σοβαρού εγκεφαλικού τραύματος. Αυτοί είναι:

- 1.η μεγάλη ηλικία του ασθενούς
- 2.οι προϋπάρχουσες της ΚΕΚ βλάβες και νόσοι του εγκεφάλου
- 3.οι παράμετροι του κώματος – χαμηλή κλίμακα Γλασκώβης
- 4.οι διαταραχές από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ)
- 5.η ύπαρξη σημείων που υποδηλώνουν βλάβες στο στέλεχος του εγκεφάλου
- 6.η φύση της εγκεφαλικής κάκωσης

7.η αυξημένη ενδοκράνια πίεση

Ο σημαντικότερος εξ' αυτών είναι η **ηλικία**, και μάλιστα φαίνεται ότι η θνησιμότητα μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση αυξάνεται όσο μεγαλύτερη είναι η ηλικία, επειδή εμφανίζονται επιπλοκές συχνότερα σε αυτή την ομάδα ασθενών. Άλλος επιβαρυντικός παράγοντας για την πρόγνωση μετά από ΚΕΚ είναι οι τυχόν **νόσοι και βλάβες του εγκεφάλου που προϋπάρχουν της κάκωσης**. Οι διάφοροι **παράμετροι του κώματος**, αποτελούν επιπλέον ισχυρούς προγνωστικούς παράγοντες. Η **κλίμακα Γλασκώβης εισόδου** σχετίζεται με την πρόγνωση. Έτσι σύμφωνα με μελέτες έχουμε:

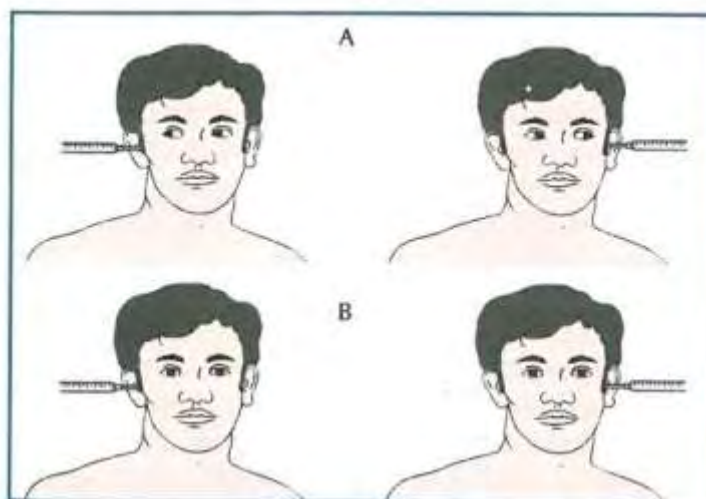
1. σε GCS 3 με 4, το 80% των ασθενών πιθανόν να καταλήξει ή να παραμείνει σε φυτική κατάσταση
2. όταν GCS είναι 5 με 7, το ποσοστό το οποίο πέφτει στο 54%
3. περαιτέρω πτώση στο 27% έχουμε όταν η Γλασκώβη εισόδου είναι 8 με 10
4. σε ασθενείς με καλή κλίμακα Γλασκώβης (11-15) τελικά το ποσοστό αυτό είναι 6% .

Η ύπαρξη ή όχι σημείων **βλάβης του στελέγους** κατά την εισαγωγή αποτελεί έναν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα. Σχετικά με το φωτοκινητικό αντανακλαστικό και κατάργηση αυτού άμφω, η θνησιμότητα είναι 65% σε ασθενείς με εστιακή βλάβη στην αξονική τομογραφία και 82% σε ασθενείς με εγκεφαλική βλάβη διάχυτη. Το φωτοκινητικό αντανακλαστικό ή αντανακλαστικό της κόρης του φωτός, παράγεται μετά από ισχυρή δέσμη φωτός από το πλάι στο μάτι που εξετάζουμε και ως αντίδραση έχουμε την αμφοτερόπλευρη μύση των οφθαλμών [212].



Εικόνα 10. Φωτοκινητικό αντανακλαστικό. Α) αντίδραση και των δύο κορών, Β) κατάργηση του, Γ) κατάργηση του άμεσου και Δ) κατάργηση και του άμεσου και του έμμεσου αντανακλαστικού.

Σε περίπτωση που δεν εκλύεται το αιθουσοφθαλμικό αντανακλαστικό η θνησιμότητα αγγίζει το 60%, ενώ η εμφάνιση αντίδρασης απεγκεφαλισμού σχετίζεται με θνησιμότητα της τάξης του 50%. Το αυθουσαιοφθαλμικό αντανακλαστικό προκαλείται από διακλυσμό του τυμπάνου με 50κ.ε. κρύο νερό στον έξω ακουστικό πόρο και ως αντίδραση έχουμε νυσταγμό με τη βραδεία φάση προς το πλάγιο του διακλυσμού και τη γρήγορη φάση προς το αντίθετο πλάγιο [212].



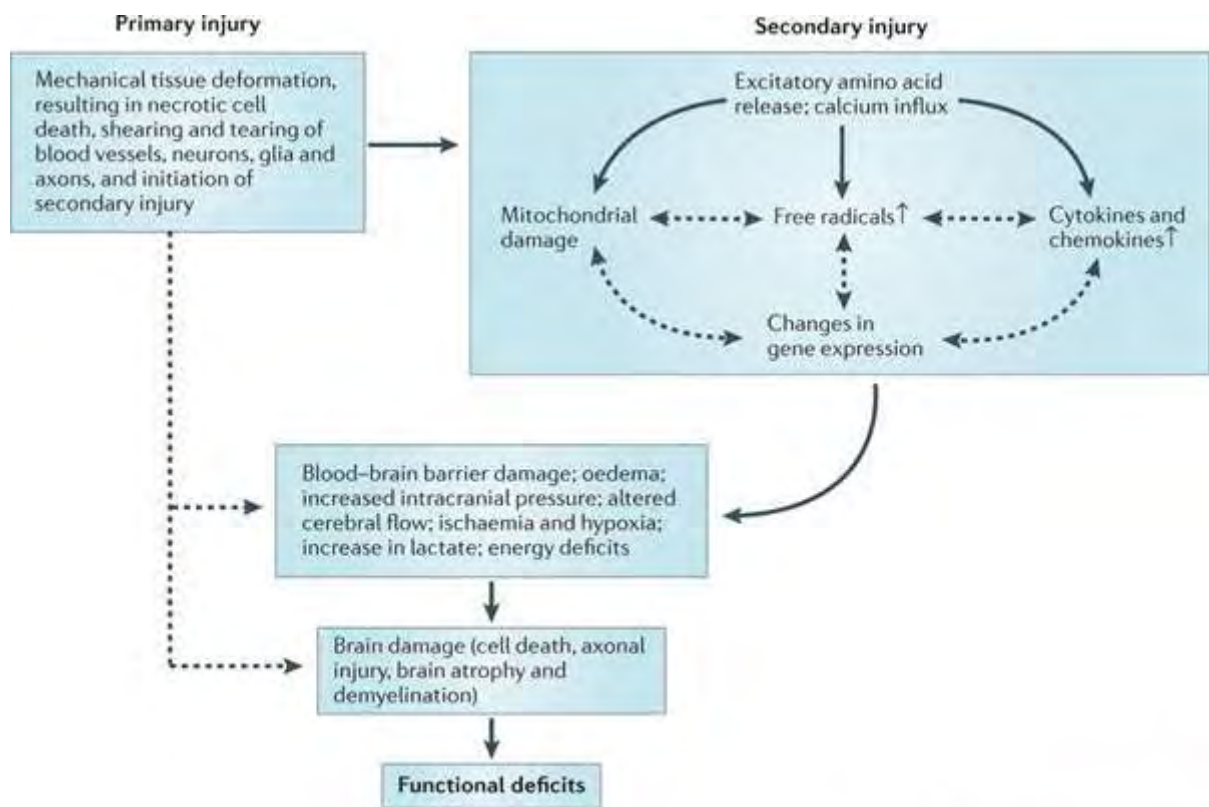
Εικόνα 11. Αιθουσονοτιαίο αντανακλαστικό. Με το διακλυσμό του ωτός με ψυχρό ύδωρ, στην εικόνα A παράγεται, ενώ δεν εικόνα B δεν παράγεται. Ανατύπωση από: Rengachary S, Wilkins RH. Principles of Neurosurgery. Mosby, London, 1994. [131]

Κακό προγνωστικό παράγοντα αποτελούν επίσης οι **διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος**, αν για παράδειγμα υπάρχει υπόταση και/ή διαταραχή της αναπνευστικής λειτουργίας. Επίσης, η **φύση της εγκεφαλικής κάκωσης** έχει προγνωστική αξία και για αυτό το λόγο αξιολογούνται τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας. Μια χωροκατακτητική εξεργασία δυσχεραίνει την έκβαση και αυξάνει σημαντικά τη θνητότητα. Ευνοϊκότερη έκβαση παρατηρείται σε ασθενείς με φυσιολογική αξονική τομογραφία ή σε ασθενείς με ύπαρξη οιδήματος, η οιδηματώδους θλάσης, υπόπυκνων ευρημάτων δηλαδή. Όταν απεικονιστικά παρατηρούνται υψηλής πυκνότητας διεργασία (επισκληρίδιο αιμάτωμα, οξύ υποσκληρίδιο αιμάτωμα, οξεία ενδοεγκεφαλική αιμορραγία, και αιμορραγικές θλάσεις) έχουμε χειρότερη πρόγνωση και μάλιστα από τη δυσμενέστερη προς την ευνοϊκότερη με τη σειρά αναφοράς αυτών. Η **αυξημένη ενδοκράνια πίεση** (>40mmHg) τέλος, σχετίζεται και αυτή με τη σειρά της με χειρότερη έκβαση λόγω της ελαττωμένης εγκεφαλικής αιμάτωσης που παρατηρείται.

Παθοφυσιολογία της ΚΕΚ

Γενικά για την παθοφυσιολογία της ΚΕΚ

Στην κρανιοεγκεφαλική κάκωση, μπορούμε να διακρίνουμε την **πρωτοπαθή** και τη **δευτεροπαθή** βλάβη. Η **πρωτοπαθής** βλάβη είναι το άμεσο αποτέλεσμα της εξωτερικής δύναμης, περιλαμβάνει τη μηχανική παραμόρφωση του ιστού και προέρχεται από τις μηχανικές δυνάμεις που εφαρμόζονται στο κρανίο και τον εγκέφαλο τη στιγμή της πρόσκρουσης. Όσον αφορά τη **δευτεροπαθή** βλάβη, οι κύριοι παράγοντες που την προκαλούν, είναι η πρόωμη υποξία και η υπόταση που εκδηλώνονται στα αρχικά στάδια της ΚΕΚ [8-13], ενώ οι πιο συχνές μορφές της είναι οι βλάβες λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, εγκεφαλικού οιδήματος, ενδοκράνιας αιμορραγίας και ενδοκράνιας υπέρτασης [14]. 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 [15-18]. Ειδικότερα σε πειραματικά ζωικά μοντέλα, η έναρξη της δευτεροπαθούς βλάβης αφορά τη διάχυτη νευρωνική αποπόλωση και την απελευθέρωση διεγερτικών νευροδιαβιβαστών (γλουταμικό και ασπαρτικό), τα οποία δεσμεύουν τους υποδοχείς του γλουταμικού και επάγουν μια μαζική σε εισροή του ασβεστίου. Το ασβέστιο ενεργοποιεί εξαρτώμενες από ασβέστιο φωσφολιπάσες, πρωτεάσες και ενδονουκλεάσες που αποικοδομούν λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Η δέσμευση του ασβεστίου στα μιτοχόνδρια οδηγεί σε διαταραχές του ασβεστίου, ενεργειακά ελλείμματα, τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών και την έναρξη της απόπτωσης. Στην ΚΕΚ έχουμε υπερέκφραση πολλών παραγόντων μεταγραφής, μεσολαβητών της φλεγμονής και νευροπροστατευτικών γονιδίων, αλλά υποεκφράζονται διάφοροι υποδοχείς νευροδιαβιβαστών και άλλοι μηχανισμοί. Η αυξημένη έκφραση επιζήμιων κυτοκινών και χημειοκινών προκαλεί εγκεφαλικό οίδημα, βλάβη του αιματεγκεφαλικού φραγμού και θάνατο των κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτών των πολύπλοκων μηχανισμών μετά από ΚΕΚ είναι τελικά βλάβη των κυττάρων και ο θάνατος αυτών, που προκαλούν λειτουργικές διαταραχές. Πειραματικά και κλινικά δεδομένα έχουν κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας δείχνουν ότι ο ενήλικος εγκέφαλος είναι σε θέση δομικής και λειτουργικής αναδιοργάνωσης μετά από τραυματισμό, που μπορεί να συμβάλλουν στην λειτουργικής αποκατάστασης. Οι διάφορες παρεμβάσεις απευθύνονται στους δεύτερους μηχανισμούς μετά τον τραυματισμό και διαμόρφωση της νευροπλαστικότητας και την λειτουργική αποκατάσταση σε ζωικά μοντέλα με ΚΕΚ [19].



Nature Reviews | Neuroscience

Εικόνα 12. Παθοφυσιολογία της ΚΕΚ σύμφωνα με μελέτες σε πειραματικά ζωικά μοντέλα Στο παραπάνω σχήμα, οι ενιαίες γραμμές αντιπροσωπεύουν καθιερωμένες αλληλεπιδράσεις-μονοπάτια, ενώ οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις πιθανές αλληλεπιδράσεις-μονοπάτια. Ανατύπωση από: Ye Xiong, Asim Mahmood & Michael Chopp. Animal models of traumatic brain injury. Nature Reviews Neuroscience 2013; 14(2):128-142. [19].

Οι μεταβολές της αιματικής ροής του εγκεφάλου

Η εγκεφαλική αιματική ροή (CBF) είναι το αποτέλεσμα της εγκεφαλικής πίεσης διήθησης (CPP) – άρδρευσης (cerebral perfusion pressure) που προωθεί το αίμα διαμέσου το αγγειακού δικτύου του εγκεφαλικού και της αντίστασης που έχουν τα εγκεφαλικά αγγεία CVR (cerebrovascular resistance). Η πίεση διήθησης υπολογίζεται ως εξής:

$$CPP = \text{Μέση Αρτηριακή Πίεση (ΜΑΠ)} - \text{Ενδοκρανιακή Πίεση (ICP)},$$

ενώ η εγκεφαλική αιματική ροή:

$$CBF = CPP / CVR \quad [7]$$

Σε φυσιολογικά επίπεδα εγκεφαλικής πίεσης αιμάτωσης (cerebral perfusion pressure), ο μηχανισμός της αυτορρύθμισης διατηρεί σταθερή την αιματική ροή του εγκεφάλου και κυμαίνεται από 50 mmHg-150 mmHg. Η διατάραξη του μηχανισμού αυτού της αυτορρύθμισης μετά από ΚΕΚ έχει ως αποτέλεσμα ο εγκέφαλος να είναι επιρρεπής σε ισχαιμία, λόγω χαμηλής πίεσης αιμάτωσης (με μειωμένη αιματική ροή) και σε αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση λόγω υψηλής

πίεσης αιμάτωσης (με αυξημένη αιματική ροή). Ακόμη κατά την οξεία φάση της ΚΕΚ, υπάρχει μια λεγόμενη περίοδος μειωμένης αιματικής ροής ενώ τις 3 πρώτες ημέρες μετά από ΚΕΚ, παρατηρείται φυσιολογική ή υψηλή αιματική ροή, η οποία συνήθως συνοδεύεται από χαμηλό μεταβολικό ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου [20]. Ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και τροποποίηση των παραμέτρων αερισμού συμβάλλουν στην αντιμετώπιση των αλλαγών στην αιματική ροή του εγκεφάλου μετά από ΚΕΚ, στοιχείο ιδιαίτερα σημαντικό διότι, αιματική ροή του εγκεφάλου χαμηλότερη από 18 ml/100gm το λεπτό σχετίζεται με δυσμενή έκβαση [21].

Κυτταρικοί μηχανισμοί και ΚΕΚ

Α) Αλλαγές στο μεταβολισμό του εγκεφάλου

Στην ΚΕΚ, υπάρχει αύξηση του μεταβολισμού της γλυκόζης για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά από αυτή [22], ενώ στα μιτοχόνδρια του εγκεφάλου παρατηρείται και μειωμένος οξειδωτικός μεταβολισμός [23, 24]. Η μείωση της συγκέντρωσης το Ν-ακέτυλ-ασπαρτικό οξύ, που συντίθεται στα μιτοχόνδρια, συναντάται και στους νευρώνες, σχετίζεται με την κάκωση και μάλιστα με τη σοβαρότητα αυτής και πιθανό να αποτελεί δείκτη της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και φαίνεται να οφείλεται σε μεταβολές της δραστηριότητας της οξειδάσης II του κυτοχρώματος c [25-27]. Επειδή ο τραυματισμένος εγκέφαλος είναι ευαίσθητος σε σχετικά μικρές αλλαγές στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου μπορεί να παρατηρηθεί μεταβολική δυσλειτουργία. Ακόμη όταν αυξάνεται το κλάσματος του εισπνεόμενου οξυγόνου έχουμε ελάττωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος του εγκεφάλου [28-30].

Β) Ο ρόλος του ασβεστίου (Ca²⁺)

Στον εξωκυττάριο χώρο η υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, και τη ρύθμιση της συγκέντρωσής του στο εσωτερικό του κυττάρου. Για να διατηρηθεί η διαφορά συγκέντρωσης του Ca²⁺, οι αντλίες αυτές που επιτρέπουν τη μεταφορά του ιόντος διαμέσου της μεμβράνης του κυττάρου, απαιτούν ΑΤΡ. Μετά από μία ΚΕΚ ενεργοποιούνται οι ΝΜDΑ υποδοχείς (N-methyl-D-aspartate) με συνέπεια την είσοδο Ca²⁺ στο εσωτερικό του κυττάρου και με αυτό εμποδίζεται η αντιμετώπιση της αυξημένης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης λόγω των χαμηλών ενεργειακών επιπέδων των νευρώνων [31-34].

Γ) Η παραγωγή και η δράση των ελευθέρων ριζών

Η κυτταρική βλάβη είναι συνέπεια της παραγωγής υπεροξειδικών και υδροξυλικών μέσα σε λίγα μόλις λεπτά μετά από μία ΚΕΚ [35]. Μέσω του μονοπατιού της 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 προκαλείται παραγωγή των ελεύθερων αυτών ριζών. Οι ελεύθερες αυτές ρίζες προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων και αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων που εξαρτώνται από τα φωσφολιπίδια, αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Καταστροφή της μεμβράνης του κυττάρου μπορεί να είναι συνέπεια αυτού. Μέσω αύξησης της συγκέντρωσης του ασβεστίου και του γλουταμινικού οξέος, οι μηχανισμοί αυτοί επεμβαίνουν και σε άλλα μονοπάτια κυτταρικής βλάβης, τα οποία με τη σειρά τους επάγουν την περαιτέρω παραγωγή ελεύθερων ριζών [36-38].

Δ) Η δράση των τοξικών παραγόντων

Σε μελέτες με πειραματικά μοντέλα που υπέστησαν ήπια και σοβαρή ΚΕΚ, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα γλουταμινικού οξέος, ενός από τους κύριους νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου που 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. Νευρική εκπόλωση και οίδημα προκαλείται από υπερενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων με τελική συνέπεια το θάνατο του νευρικού κυττάρου. Οι τρεις προαναφερθέντες υποδοχείς έχουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης που οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου [32-34]. Τοξικά αμινοξέα σε αυξημένα επίπεδα έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς που είχαν υποστεί ΚΕΚ, έως μάλιστα και 50 φορές πιο υψηλά από τα φυσιολογικά επίπεδα σε ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ, με εγκεφαλικές θλάσεις ή με δευτεροπαθή ισχαιμικά επεισόδια [39].

Ε) Αξονική βλάβη και καταστροφή του κυτταροσκελετού

Τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριου ασβεστίου, οδηγούσε σε μη-αναστρέψιμη ενεργοποίηση της καλπεΐνης. Έτσι στην ΚΕΚ έχουμε αξονική βλάβη και καταστροφή του κυτταροσκελετού, πιθανόν μέσω ενεργοποίησης της πρωτεάσης καλπεΐνης (proteasecalpain) [40, 41] και πολύ σημαντικό, όταν ανασταλεί η δράση της καλπεΐνης, (όπως έγινε σε μελέτες σε μοντέλα τρωκτικών που υπέστησαν ΚΕΚ), έχουμε βελτίωση της νευρολογικής έκβασης [42, 43].

Η Απόπτωση

Ο νευρωνικός θάνατος, βρέθηκε σε μελέτες τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και σε ασθενείς που υπέστησαν ΚΕΚ, πιθανό να μην είναι ένα μονοπάτι καταστροφικών γεγονότων μη-αναστρέψιμο. Η ενεργοποίηση ειδικών γονιδίων μάλιστα, αντίθετα, σε μερικούς κυτταρικούς πληθυσμούς πιθανό να είναι επάγουν μια πολύπλοκη αλληλουχία γεγονότων [44-47]. Βελτίωση της νευρολογικής έκβασης μετά από πειραματική ΚΕΚ έχουμε με την αναστολή της απόπτωσης μέσω του NGF παράγοντα (nerve growth factor) [48]. Στην αποκατάσταση των νευρικών κυττάρων που έχουν καταστραφεί ή στη απόπτωση μετά από ΚΕΚ διαδραματίζουν σημαντικό

ρόλο η Bcl-2 συμβάλλοντας στην επιβίωση των νευρωνικών πληθυσμών και οι πρωτεΐνες της οικογένειας των κασπασών επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο [49].

H δημιουργία και τα είδη του εγκεφαλικού οιδήματος

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι εγκεφαλικού οιδήματος:

- 1.το αγγειογενές και
- 2.το κυτταροτοξικό [214].

Στη ΚΕΚ, και οι δύο τύποι του οιδήματος είναι παρόντες στον εγκεφαλικό ιστό και αναπτύσσονται σε ένα διφασικό πρότυπο: το αγγειοκινητικό οίδημα εμφανίζεται στις πρώτες λίγες μετά το τραύμα ώρες, ως αποτέλεσμα της ρήξης του BBB, η οποία αποκαθίσταται σταδιακά μέσα στις επόμενες 7 ημέρες, ενώ το κυτταροτοξικό οίδημα αναπτύσσεται πιο αργά, αλλά επιμένει για μέχρι και 2 εβδομάδες [217].

A) Αγγειογενές οίδημα εγκεφάλου

Το αγγειογενές οίδημα συμβαίνει όταν διαταραχθεί ο BBB προκαλώντας μια καθαρή ροή του νερού, που προκαλείται από την διαφορά της υδροστατική πίεσεως από το αίμα προς τον εγκέφαλο [215]. Η περίσσεια του διηθούμενου νερού μαζί με πρωτεΐνες του πλάσματος και ηλεκτρολύτες διευρύνουν το διάμεση χώρο [216]. Παρατηρείται συνήθως σε χωροκατακτητικές εξεργασίες, όπως όγκοι και αποστήματα, καθώς και σε έμφρακτα, σε μικρότερο όμως βαθμό [7].



Εικόνα 13. Στην εικόνα παρουσιάζεται αγγειοκινητικό οίδημα του εγκεφάλου μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.

B) Κυτταροτοξικό οίδημα εγκεφάλου

Κυτταροτοξικό οίδημα συμβαίνει όταν τα τραυματίζονται τα κύτταρα του εγκεφάλου και η Na-K-ATPάση αποτυγχάνει να διατηρήσει τη διαμεμβρανική ισορροπία των ιόντων, ενώ ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (BBB: Blood-Brain-Barrier) παραμένει άθικτος. Τα κύτταρα διογκώνονται από τη εισροή υγρού από το αγγειακό διαμέρισμα. Παρά το γεγονός ότι όλοι οι τύποι των κυττάρων του εγκεφάλου διογκώνονται στο κυτταροτοξικό οίδημα, τα αστροκύτταρα συνεισφέρουν στο έπακρο την διόγκωση του εγκεφάλου. Εμφανίζεται κυρίως σε υποξία και ισχαιμία και είναι πολύ συχνός σε εγκεφαλικά έμφρακτα [7].



Εικόνα 14. Στην εικόνα παρουσιάζεται κυτταροτοξικό οίδημα εγκεφάλου σε ασθενή με όγκο.

Πρώιμη διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού προκαλείται μετά από ΚΕΚ και μάλιστα πιο εκτεταμένη στις περιοχές της εγκεφαλικής θλάσης και όταν οι θλάσεις είναι πολλαπλές, μπορεί να έχουν ως συνέπεια σε μαζικό οίδημα και αυξημένη ενδοκράνια πίεση. Έχει παρατηρηθεί μείωση της διάχυσης του νερού 45min μετά από πειραματική ΚΕΚ και το εκτεταμένο ενδοκυττάριο οίδημα που αναπτύχθηκε παρέμεινε για 2 εβδομάδες μετά την βλάβη [50]. Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων που σχετίστηκε με την ανάπτυξη εκτεταμένου οιδήματος στην περιοχή της αιμορραγίας [51]. Στο μηχανισμό σχηματισμού του οιδήματος, είναι ίσως να συμμετέχει η απελευθέρωση του VEGF παράγοντα (vascular endothelial growth factor) από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια..



Εικόνα 15. Η πρόκληση του αγγειογενούς και του κυτταροτοξικού εγκεφαλικού οιδήματος κατά τη διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ανατύπωση από: Τσικόπουλος, Φίλιππος, Δ., *Νευροχειρουργική κριτική και πρακτική προσέγγιση*, Αθήνα, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., [7]. Η εικόνα είναι τροποποιημένη από το βιβλίο «*Neuroanatomy through Clinical Cases* H. Blumenfeld, 2002» [130].

Η εκδήλωση της εγκεφαλικής ισχαιμίας

Ο εγκεφαλικός ιστός που έχει τραυματιστεί είναι ευαίσθητος στην ανάπτυξη ισχαιμίας σύμφωνα με μελέτες σε εγκεφάλους ασθενών που υπέστησαν ΚΕΚ, και δείχνουν την παρουσία ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης, η διάγνωση της οποίας διευκολύνεται με τη μέτρηση του

κορεσμού του φλεβικού οξυγόνου στο σφαγιτιδικό βολβό. Ένα τουλάχιστον επεισόδιο υπότασης ή υποξίας παρουσιάζει το 35% των ασθενών με ΚΕΚ και μάλιστα εκδήλωση ενός επεισοδίου υπότασης σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα. Μείωση του κορεσμού του οξυγόνου σε επίπεδα χαμηλότερα από 50 mmHg προκαλείται σε εγκεφαλική ισχαιμία. Το 39% των ασθενών με σοβαρή ΚΕΚ, σύμφωνα με μία μελέτη, εμφανίζουν τουλάχιστον ένα επεισόδιο μη-κορεσμού του σφαγιτιδικού βολβού [52], τα οποία σχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα και φανερώνουν ότι η ισχαιμία αποτελεί σημαντικό στοιχείο της δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ. Η αύξηση της εγκεφαλικής πίεσης αιμάτωσης (>60mmHg) σύμφωνα με μελέτες φαίνεται να μην βελτιώνει την εγκεφαλική έκβαση, και μάλιστα, ίσως, επιδεινώνει το εγκεφαλικό οίδημα [53]. Διάχυτη θρόμβωση στο εσωτερικό των εγκεφαλικών αγγείων βρέθηκε σε μια μελέτη πειραματικών μοντέλων και ασθενών που υπέστησαν ΚΕΚ [54] και ίσως αποτελεί επιπρόσθετο μηχανισμό για την εκδήλωση εγκεφαλικής ισχαιμίας.

Η συμβολή της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και ο ρόλος του οξειδωτικού stress

Η δευτεροπαθής εγκεφαλική βλάβη μετά από ΚΕΚ, επιτείνεται λόγω της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και του οξειδωτικού stress [198, 199, 211]. Όταν συμβεί θλάση στον εγκεφαλικό ιστό συμβαίνουν τα εξής: μείωση της αιματικής ροής, βλάβη των αγγείων και κατ' επέκταση τοπική ισχαιμία, απώλεια της ικανότητας των αγγείων του εγκεφάλου για αυτορρύθμιση, καθώς και συστηματική υπόταση. Αφού λοιπόν συμβεί αυτή η ισχαιμία λόγω θλάσης, ακολουθεί η επαναιμάτωση. Η επαναιμάτωση στη συνέχεια έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και των ενδιάμεσων του ενεργού οξυγόνου (reactive oxygen intermediates) [200]. Τελική συνέπεια όλων αυτών είναι ο θάνατος των νευρικών κυττάρων.

Η φλεγμονώδης αντίδραση στην ΚΕΚ

Στην παθογένεση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από τραύμα γίνεται φανερός, ολοένα και περισσότερο ο ρόλος της φλεγμονώδους αντίδρασης [55, 56, 57]. Στο σημείο του τραύματος έχουμε διήθηση ανοσοποιητικών κυττάρων και δημιουργία οιδήματος, ενώ συμβαίνει ενεργοποίηση διαφόρων φλεγμονωδών εγκεφαλικών κυττάρων (αστροκύτταρα, μικρογλοία, ενδοθηλιακά κύτταρα), και επακόλουθη 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.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΚΡΑΝΙΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ

Η γενετική βάση της ΚΕΚ

Στην παθοφυσιολογία, την έκβαση καθώς και την πρόγνωση των ΚΕΚ, σύμφωνα με πολλές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία, εμπλέκονται διάφορα γονίδια. Συνοπτικά τα γονίδια που έχουν μελετηθεί για συσχέτιση με ΚΕΚ καθώς και η θέση αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Γονίδια που έχουν μελετηθεί για συσχέτιση με ΚΕΚ και η θέση αυτών	
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΘΕΣΗ
APOE	19q13.2
Neprilysin	3q25.2
p53	17p13.1
ACE	17q23.3
DRD2	11q23
DAT	5p15.33
COMT	22q11.21
ΓΟΝΙΔΙΑ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΩΝ	
IL-1A	2q14
IL-1B	2q14
IL1RN	2q14.2
IL-6	7p21
SLC6A4	17q11.2
MAOA	Xp11.3
CACNA1A	19p13
NEFH	22q12.2
AQP4	18q11.2
NOS3	7q36
BDNF	11p13
MTHFR	1p36.3
Neuroglobin	14q24.3
BCL2	18q21.3
PPP3CC	8p21.3
PARP-1	1q42.12
ADORA1	1q32.1
KIBRA	5q34
GAD1	2q31.1

Πολλοί γενετικοί καθώς και επίκτητοι παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν την έκβαση μετά από ΚΕΚ, και να συμβάλλουν στην ανομοιογένεια της κλινικής έκβασης σε κάποιο βαθμό. Λαμβάνοντας υπόψη τη φλεγμονή, την ανοσία, το οξειδωτικό στρες, τη δυσλειτουργία του κυτταροσκελετού και των μιτοχονδρίων, την απόπτωση και τη νευροεκφύλιση σε μία ΚΕΚ, δηλαδή τους διάφορους και πολύπλοκους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της βλάβης των νευρικών κυττάρων μετά από μία κάκωση καθώς και τον υπέρτοπο αριθμό των γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτούς τους μηχανισμούς, αντιλαμβανόμαστε πως μόνο ένα πολύ μικρό μέρος των γονιδίων έχει μελετηθεί και χρειάζονται επιπλέον μελέτες σε άλλα γονίδια και σε πολλές ομάδες ασθενών. Απαραίτητη κρίνεται η επιλογή μεγάλων ομάδων ελέγχου και διάφορα επίπεδα διεκπεραίωσης της μελέτης όπως γενετική, γονιδιωματική, μεταγραφική, πρωτεομική ή επιγενετική [62].

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ των διάφορων μελετών για την γενετική των ΚΕΚ πιθανόν να εξηγούνται από διάφορα γεγονότα κατά τις μελέτες. Τέτοια γεγονότα για παράδειγμα ο μικρός αριθμός δειγμάτων, τα σφάλματα επιλογής, η μη αρμόζουσα ταξινόμηση των κατηγοριών έκβασης καθώς και η αποτυχία σταθεροποίησης για σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες της έκβασης (ηλικία, φύλο, θεραπείες οξείας φάσης και αποκατάστασης). Ακόμη ο τύπος των ΚΕΚ (κλειστή, ανοιχτή), οι εθνότητες στις οποίες πραγματοποιούνται οι μελέτες και επομένως η διαφορά στο γενετικό υπόβαθρο, το είδος των μετρήσεων και το χρονικό σημείο της κάθε έκβασης, διαδραματίζουν το δικό τους ρόλο στα αποτελέσματα των μελετών. Η εξασφάλιση μεγαλύτερων αριθμών συμμετεχόντων, η ελαχιστοποίηση στα σφάλματα κατά την επιλογή και η ανίχνευση πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ γενετικών τόπων και επιδημιολογικών-περιβαλλοντικών παραγόντων θα μπορούσαν στο μέλλον με τη συνεργασία πολλών κέντρων, να παρέχει ασφαλέστερα και πιο ακριβή αποτελέσματα.

Παρόλα αυτά, οι μέχρι σήμερα μελέτες προσφέρουν πολλά στη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της βλάβης του νευρικού ιστού μετά από ΚΕΚ, όμως η δημιουργία νέων θεραπειών στο μέλλον θα αξιολογήσει κατά πόσο η εμπλοκή κάποιου γονιδίου στο παθογενετικό προφίλ της ΚΕΚ μπορεί να συνεισφέρει στην προαγωγή της υγείας. Η χρήση αντι-νοηματικών (anti-sense) ολιγονουκλεοτιδίων για την ανακατεύθυνση και αποκατάσταση μεταλλάξεων ματίσματος (splicing) [63] ή την παράκαμψη μεταλλάξεων μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης (frameshift) [64] ή αξιοποίηση του μηχανισμού της RNA παρέμβασης (RNA interference) με τη χρήση μικρών θραυσμάτων RNA με σκοπό την αναστολή της έκφρασης παθογόνων γονιδίων ή τη στοχευμένη χρήση επιγενετικών φαρμάκων με σκοπό την αποσιώπηση ή τη διέγερση της έκφρασης γονιδίων θα μπορούσαν να αναπτυχθούν στο μέλλον.

Γονίδια που έχουν μελετηθεί σε ασθενείς με ΚΕΚ:

1. ACE

Για το γονίδιο ACE γίνεται εκτενής αναφορά στη συνέχεια.

2. APOE

Πολλές μελέτες έχουν διενεργηθεί, οι οποίες διερευνούν το ρόλο του πολυμορφισμού του γονιδίου της APOE στη ΚΕΚ [69,70] και στην πλειονότητα αυτών διερευνάτε η επίδραση του πολυμορφισμού της APOE στην κινητική λειτουργική αποκατάσταση όπως μετράται με βάση την κλίμακα έκβασης της Γλασκώβης (Glasgow Outcome Scale, GOS) [71-85]. Σε μια μετα-ανάλυση 14 μελετών (από σύνολο 23 σχετικών μελετών που αναγνωρίστηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία) και σε σύνολο 2427 συμμετεχόντων βρέθηκε ότι το αλληλόμορφο 4 της APOE αυξάνει τον κίνδυνο για δυσμενή έκβαση μετά από ΚΕΚ [86].

Ο πολυμορφισμός του γονιδίου της APOE έχει μελετηθεί ως προς διάφορους άλλους παράγοντες, όπως η εναπόθεση του Αβ αμυλοειδούς [87], τα ευρήματα προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Tunnel ιστοχημεία) [88], ο όγκος των ιπποκάμπων και η πιθανή παρουσία εγκεφαλικής ατροφίας [89], η εγκεφαλική αιματική ροή [90], η παρουσία εστιακών βλαβών στον εγκέφαλο [91], ο όγκος αιματώματος [71], η παρουσία ισχαιμικής βλάβης ή θλάσεων [92-94], οιδήματος [95], αμυλοειδικής αγγειοπάθειας [96], οι συγκεντρώσεις νευροδιαβιβαστών [97], η εγκεφαλική πίεση αιμάτωσης (CPP) [81] και η ηλεκτροεγκεφαλογραφική δραστηριότητα [98], η κλινική νευρολογική επιδείνωση [99-102], η θνητότητα [103], η Γλασκώβη εισόδου [80, 82, 84, 86, 101], μετρήσεις λειτουργικής ανεξαρτησίας [104, 105], διάφορες νευροψυχολογικές δοκιμασίες [75, 76, 106-117], η μετατραυματική αμνησία [84, 118], η ικανότητα για εργασία [119], ο κίνδυνος για εμφάνιση της νόσου Alzheimer [120-126], η διαταραχή της λειτουργίας της υπόφυσης [127], ο κίνδυνος για μετατραυματικών επιληπτικών κρίσεων [74] και οι ψυχιατρικές διαταραχές [125]. Για τον G-219T πολυμορφισμό του υποκινητή του γονιδίου της APOE έχει βρεθεί ότι οι φορείς του γονοτύπου TT έχουν χειρότερη έκβαση σε σύγκριση με τους GG και GT, ενώ για τον -491 A/T πολυμορφισμό δεν προέκυψε συσχέτιση ως προς την έκβαση των ασθενών [66].

3. Neprilysin

Ένας πολυμορφισμός GT επαναλήψεων στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της neprilysin μελετήθηκε σε 81 ασθενείς που υπέστησαν ΚΕΚ, και οι ασθενείς με περισσότερες GT επαναλήψεις είχαν αυξημένη προδιάθεση σχηματισμού αμυλοειδικών πλακών [133].

4. p53

Το p53 γονίδιο, είναι ένα γονίδιο ρυθμιστής της απόπτωσης [134] και στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται ο μηχανισμός της απόπτωσης [135]. Σε αυτό εμφανίζεται πολυμορφισμός που καταλήγει σε προλίνη (pro) ή αργινίνη (arg) στο αμινοξύ 72 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης [136]. Έχει διαπιστωθεί ότι στους ασθενείς με μη-ευνοϊκή έκβαση, η συχνότητα του Arg/Arg γονοτύπου ήταν υψηλότερη και επίσης συσχετίστηκε με μεγαλύτερο κίνδυνο για δυσμενή έκβαση κατά την έξοδο από τη Μ.Ε.Θ. (μονάδα εντατικής θεραπείας) [137].

5. Interleukins (IL-1α, IL-1β, IL1RN, IL-6)

Το γονίδιο της **IL-1A** έχει μελετηθεί σε ασθενείς με ΚΕΚ σε δύο μελέτες από τις οποίες όμως δεν προέκυψε κάποια θετική συσχέτιση [138, 139].

Σχετικά με το γονίδιο της **IL-1B**, οι φορείς του IL-1B(+3953)*2 φαίνεται να έχουν μη-ευνοϊκή έκβαση σε σύγκριση με μη-φορείς του αλληλίου 2. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για φορείς του IL-1B(-511)*2 σε σύγκριση μη-φορέων του αλληλίου 2 [140]. Ωστόσο σε μια μελέτη που διενεργήθηκε από το εργαστήριό μας (Hadjigeorgiou και συν. [141] δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού IL-1B(-511) με την GCS εισόδου και την 6μηνη έκβαση με βάση την GOS. Παθολογοανατομική μελέτη ασθενών που κατέληξαν μετά από σοβαρή ΚΕΚ εξετάστηκε πιθανή συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών των γονιδίων της IL-1α και IL-1β και της έκτασης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο δε διαπιστώθηκαν διαφορές στα ποσοστά των αποπτωτικών κυττάρων ανάμεσα στους γονότυπους [88].

Για το γονίδιο της **IL1RN**, σε μια μελέτη στο εργαστήριο Νευρογενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε ασθενείς με ΚΕΚ [141] βρέθηκε ότι οι φορείς του αλληλομόρφου 2 της IL1RN (από τα 5 στα οποία καταλήγει) σχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο μετατραυματικής αιμορραγίας σε απεικονιστικό έλεγχο με αξονική τομογραφία. Επίσης, το ίδιο αλληλόμορφο σχετίστηκε με βαρύτερη κλινική εικόνα εισόδου (GCS) (p=0.045) αλλά ταυτόχρονα με ευνοϊκότερη κλινική έκβαση (GOS) [142-144].

Τέλος για το γονίδιο της **IL-6**, έχει βρεθεί σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών με εξάλειψη του γονιδίου της IL-6 ότι η κάκωση του εγκεφάλου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόπτωσης των νευρικών κυττάρων [145]. Σε ENY (εγκεφαλονωτιαίο υγρό) ασθενών με ΚΕΚ έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της IL-6 ήταν πιο αυξημένα σε ασθενείς που παρουσίασαν ευνοϊκότερη έκβαση [146]. Όσον αφορά τον rs1800795 (174 C/G) στον υποκινητή του γονιδίου της IL-6, το αλληλόμορφο G και ο γονότυπος GG σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή IL-6,

χωρίς όμως να διαπιστωθεί παρουσία συσχέτισης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την εξάμηνη GOS σε ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ που εισήχθησαν στην μονάδα εντατικής θεραπείας σε μία μελέτη [147]. Αντίθετα σε μία άλλη μελέτη σε άρρενες ασθενείς με βαριά ΚΕΚ (GCS εισόδου 3-8) βρέθηκε ότι ο γονότυπος GG ή το αλληλόμορφο G σχετιζόταν με αυξημένη πιθανότητα για επιβίωση και λήψη εξιτηρίου από τη ΜΕΘ [148].

6. DRD2 και DAT

Για το γονίδιο **DRD2** (dopamine D2 receptor gene) έχει εκτεταμένα μελετηθεί ο rs1800497, ένας C/T πολυμορφισμός γνωστός ως Taq1 πολυμορφισμός του DRD2 γονιδίου. Σε ασθενείς με ήπια ΚΕΚ έχει εκτιμηθεί η λειτουργία της μνήμης και της προσοχής σε συνδυασμό με την παρουσία του T αλληλίου, σε 2 ομάδες ασθενών και υγείων. Οι φορείς του T αλληλίου και στις 2 ομάδες είχαν χειρότερη απόδοση στην κλίμακα λεκτικής ευχέρειας CVLT (California Verbal Learning Test) σε σύγκριση με τους μη-φορείς. Στην CPT κλίμακα (Continuous Performance Test), μιας κλίμακας με την οποία γίνεται εκτίμησης της λειτουργίας του μετωπιαίου λοβού, ανάμεσα στους φορείς ή μη- του T αλληλίου των δύο ομάδων δεν υπήρχαν διαφορές. Οι φορείς όμως 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. Ακόμη, δεν υπήρξαν 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. Το T αλληλόμορφο του ίδιου πολυμορφισμού rs1800497 σχετίστηκε με καλύτερη έκβαση σε διάφορες νοητικές λειτουργίες μετά την ΚΕΚ [149].

Σε μία άλλη μελέτη ομοζυγώτες με σοβαρή ΚΕΚ για τις 10 επαναλήψεις του VNTR πολυμορφισμού (ένας πολυμορφισμός ποικίλων εν σειρά επαναλήψεων (VNTR) του γονιδίου μεταφοράς της ντοπαμίνης (dopamine transporter gene, **DAT**) είχαν υψηλότερα επίπεδα ντοπαμίνης στο ENY [150].

7. COMT

Το γονίδιο catechol-o-methyltransferase (COMT), το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο που απενεργοποιεί τη δράση της ντοπαμίνης (DA) και της νορεπινεφρίνης (NE), εμφανίζει τρεις ισομορφές: 1.COMT Val/Val, 2.COMT Val/Met, και 3.COMT Met/Met. Ο πολυμορφισμός Val58Met του γονιδίου COMT σε μία μελέτη σε 109 άρρενες απόστρατους πολέμου με διατηραίνουσες κακώσεις της κεφαλής δεν διαπιστώθηκε να έχει κάποια σημαντική επίδραση του σε διάφορες δοκιμασίες γενικής νοημοσύνης. [152]. Για τον ίδιο πολυμορφισμό, βρέθηκε συσχέτιση με τις ανώτερες εκτελεστικές λειτουργίες μετά από ΚΕΚ [65].

8. SLC6A4

Σε μία μελέτη σε ασθενείς με ΚΕΚ δε διαπιστώθηκε κάποια συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό 5-HTTLPR (rs25531) του γονιδίου που κωδικοποιεί τον μεταφορέα της σεροτονίνης [solute carrier family 6 (serotonin neurotransmitter transporter), member 4;SLC6A4] και την εμφάνιση κατάθλιψης μετά από ΚΕΚ. Στη μία άλλη μελέτη για τον ίδιο πολυμορφισμό διαπιστώθηκαν φαρμακοδυναμικές συνέπειες. Ειδικότερα ασθενείς με μετατραυματική επιληψία μετά από ΚΕΚ, παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών στη citalopram [153].

9. MAO-A

Μια μελέτη σε απόστρατους πολέμου με διατιτραίνουσες ΚΕΚ κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο λειτουργικός πολυμορφισμός ποικίλων εν σειρά επαναλήψεων (variable number tandem repeat, VNTR) του γονιδίου της monoamine oxidase A (MAO-A) συμβάλει στην εμφάνιση επιθετικής συμπεριφοράς μόνο όταν ο προ-μετωπιαίος φλοιός είναι ακέραιος [154].

10. CACNA1A

Μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη του γονιδίου CACNA1A που κωδικοποιεί τα κανάλια Ca²⁺ (CACNA1A calcium channel subunit gene), με αντικατάσταση της σερίνης σε λυσίνη, έχει συσχετισθεί, μετά από σχετικά μικρής έντασης ΚΕΚ, σε 3 μόλις ασθενείς, με την εμφάνιση εκτεταμένου-όψιμου εγκεφαλικού οιδήματος, βαριάς κωματώδους κατάστασης και θανάτου [155].

11. NEFH

Έχει εξεταστεί η πιθανή συσχέτιση του rs165602, ενός non-synonymous πολυμορφισμού του NEFH γονιδίου με τη συχνότητα και σοβαρότητα των εγκεφαλικών διασεισεων αναδρομικά με βάση το ιστορικό που ελάμβαναν από τους συμμετέχοντες, χωρίς όμως να προκύψει κάποια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό του γονιδίου της NEFH και την συχνότητα και σοβαρότητα των εγκεφαλικών διασεισεων [156].

12. AQP4

Στους ασθενείς με ΚΕΚ εξετάστηκε η επίδραση πολυμορφισμών στο εξόνιο 4 του γονιδίου της AQP4 στην αρχική κλινική εικόνα των ασθενών (GCS), την παρουσία οιδήματος στην αξονική

τομογραφία και την έκβαση των ασθενών (GOS), όμως δε διαπιστώθηκε η παρουσία κάποιου πολυμορφισμού στους συμμετέχοντες με ΚΕΚ [157].

13. Endothelial nitric oxide synthase

Έχει διαπιστωθεί μία δόσοεξαρτώμενη επίδραση του πολυμορφισμού -786C/T (rs2070744) του γονιδίου της ενδοθηλιακής συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (endothelial nitric oxide synthase, NOS3) σε διάφορες αιμοδυναμικές παραμέτρους αιμάτωσης του εγκεφάλου μετά από ΚΕΚ (μεταξύ άλλων στη εγκεφαλική αιματική ροή, τον όγκο και την ταχύτητα ροής του αίματος στην έσω καρωτίδα μέσα στις πρώτες 12 ώρες και στις 48 ώρες μετά την κάκωση) όπως επίσης και στη θνητότητα των ασθενών [158].

14. BDNF

Σε μία μελέτη προέκυψε σημαντική συσχέτιση δύο πολυμορφισμών (rs7124442, rs1519480) του γονιδίου εγκεφαλογενή νευροτροφικού παράγοντα (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) που βρίσκονται στο 3' άκρο του γονιδίου με την απόδοση των ασθενών στις συγκεκριμένες δοκιμασίες νοημοσύνης [152.] Σε μελέτη της ίδιας ομάδας διαπιστώθηκε επίδραση του πολυμορφισμού Val66Met (rs6265) στην βελτίωση των εκτελεστικών λειτουργιών μετά την κάκωση [159]. Ακόμη βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός Val66Met σχετιζόταν με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με citalopram ασθενών με κατάθλιψη μετά από ΚΕΚ [153]. Δεν φαίνεται όμως να υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής του Val66Met πολυμορφισμού στην επάνοδο του επιπέδου συνείδησης σε ασθενείς που ήταν σε φυτική κατάσταση 1 μήνα μετά από ΚΕΚ [160]. Σε ασθενείς που υπέστησαν ΚΕΚ ήπιας ή μέτριας βαρύτητας φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός Met66Val (rs6265) επηρεάζει την ταχύτητα επεξεργασίας πληροφοριών αλλά όχι τις μετρήσεις της μνημονικής λειτουργίας, οι οποίες επηρεαζόταν από τέσσερις άλλους πολυμορφισμούς (rs11030102, rs11030107, rs12273363 και rs7127507) [161].

15. MTHFR

Έχει διαπιστωθεί ότι οι ασθενείς με το γονότυπο TT του πολυμορφισμού -677T/C του γονιδίου MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη μετατραυματικής επιληψίας [162] και έχει συσχετισθεί με καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών με κατάθλιψη μετά από ΚΕΚ στη θεραπεία με citalopram [153].

16. KIBRA

Διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με το γονότυπο CC του πολυμορφισμού rs17070145 του γονιδίου KIBRA (kidney and brain protein), σε ασθενείς με σοβαρή ΚΕΚ είχαν καλύτερη απόδοση στις μετρήσεις επεισοδιακής μνήμης συγκριτικά με τους φορείς του αλληλομόρφου T [167].

17. GAD1

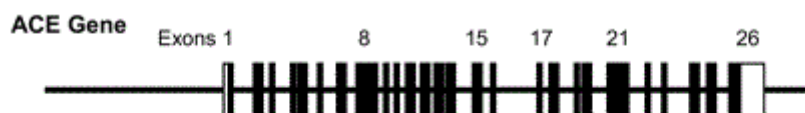
Επίσης έχει βρεθεί ότι πολυμορφισμοί του γονιδίου glutamic acid decarboxylase 1 (GAD1) που συμμετέχουν στο σχηματισμό του νευροδιαβιβαστή gammaaminobutyric acid (GABA) επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης κρίσεων E μετά από ΚΕΚ [168].

18. Άλλα γονίδια (neuroglobin, BCL2, PARP-1, ADORA1)

Για τα γονίδια **neuroglobin** [163], B-cell-2 (**BCL2**) [164], και poly ADP-ribose polymerase (**PARP-1**) έχουν επίσης ανιχνευθεί συσχετίσεις με τη λειτουργική κινητική αποκατάσταση μετά από ΚΕΚ με βάση την GOS [165] ενώ πολυμορφισμοί στο γονίδιο adenosine A1 receptor (**ADORA1**) σχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο για μετατραυματικές επιληπτικές κρίσεις [166].

Το γονίδιο ACE

Το γονίδιο του ACE στον άνθρωπο έχει μήκος 21 ζεύγη Kb και αποτελείται από 26 εξόνια και 25 ιντρόνια. Έχει χαρτογραφηθεί στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17q23). Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί που έχουν περιγραφεί στο γονίδιο του ACE ενζύμου, είναι πολυμορφισμοί απλού νουκλεοτιδίου (SNPs: single nucleotide polymorphism).



Εικόνα 16. Το γονίδιο ACE. Τροποποιημένη εικόνα από: Roskopf D, Michel MC. Pharmacogenomics of G protein-coupled receptor ligands in cardiovascular medicine. *Pharmacol Rev.* 2008 Dec;60(4):513-35 [129]

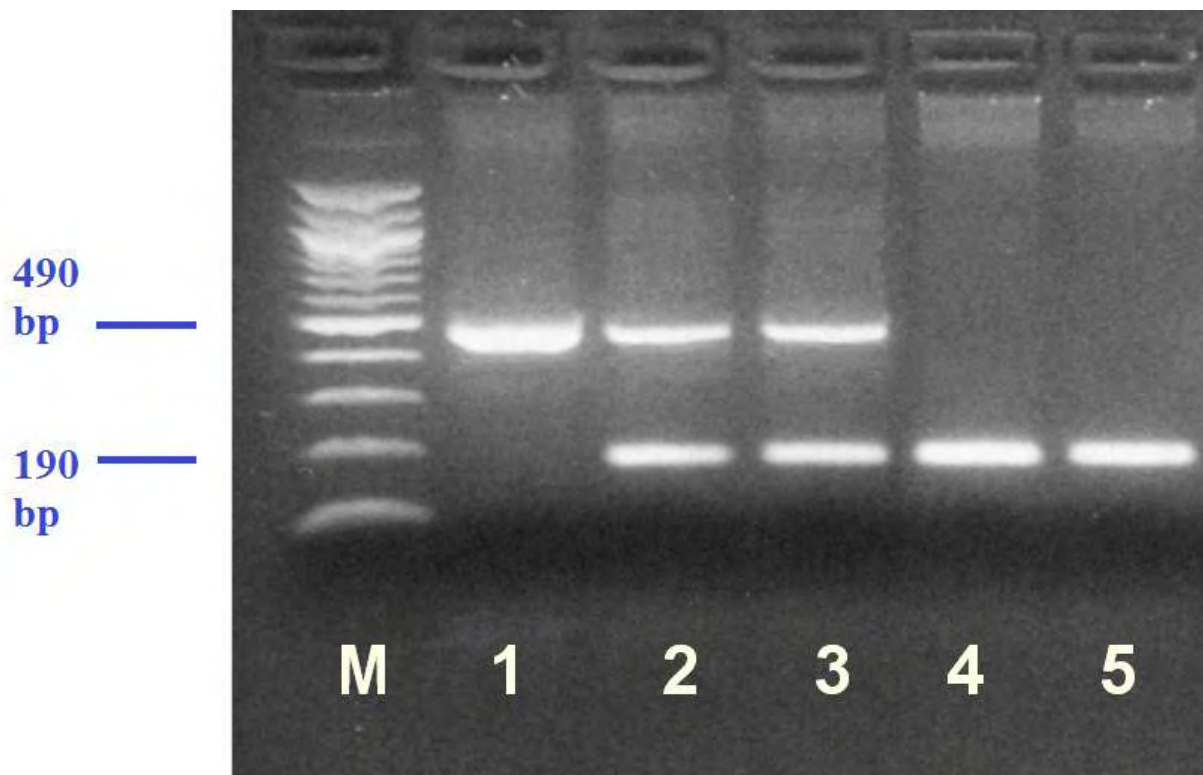
Δύο ισομορφές κωδικοποιούνται από το γονίδιο του ACE:

1. η σωματική μορφή (somatic ACE), που έχει MB 170KDa και εκφράζεται στους διάφορους ιστούς του σώματος, και
2. η ορχική μορφή (testicular ACE), με MB 100KDa, που εκφράζεται στα αρχέγονα κύτταρα των όρχεων [182], με αδιευκρίνιστη λειτουργία.

Για την έναρξη της έκφρασης των ισομορφών αυτών, είναι υπεύθυνοι δύο διαφορετικοί υποκινητές:

1. έναν υποκινητή που βρίσκεται στο 5'-άκρο του πρώτου εξονίου υπεύθυνο για τη μεταγραφή της σωματικής μορφής του ACE ενζύμου (sACE), και οδηγεί στη μεταγραφή όλων των εξονίων. Στο ώριμο mRNA του sACE ενζύμου όλα τα εξόνια (1-26) μεταγράφονται, εκτός από το εξόνιο 13 που απομακρύνεται με τη διαδικασία του ματίσματος (splicing) και
2. έναν υποκινητή, που αποτελείται από 91bp και βρίσκεται στο ιντρόνιο 12, υπεύθυνο για τη μεταγραφή της ορχικής μορφής του ACE ενζύμου (tACE). Το mRNA του tACE ενζύμου περιλαμβάνει τα εξόνια 13-26. Το sACE ένζυμο διαθέτει δύο ενεργά κέντρα (N- και C-περιοχές), ενώ το tACE ένζυμο αποτελείται από ένα μόνο ενεργό κέντρο [183].

Ο πολυμορφισμός ένθεσης/έλλειψης (I/D: insertion/deletion) στο ιντρόνιο 16 του ACE γονιδίου που καταλήγει σε τρεις γονοτύπους (II, ID και DD), επηρεάζει τα επίπεδα του ACE ενζύμου [184]. Ειδικότερα τα επίπεδα του ACE ενζύμου στο πλάσμα είναι υψηλότερα στα άτομα με DD γονότυπο [185]. Επιπλέον, το I αλληλίο πιθανό να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νόσου Alzheimer [186, 187], ενώ το D αλληλίο έχει συσχετιστεί τόσο με μειωμένη γνωστική λειτουργία στον γενικό πληθυσμό [188, 189, 190] όσο και με άνοια σε ηλικιωμένα άτομα ηλικίας 74 ετών και άνω [188].



Εικόνα 17. Οι τρεις γονότυποι του ACE γονιδίου. Διαχωρισμός των PCR προϊόντων της ACE I/D με ηλεκτροφόρηση σε 2% πηκτή αγαρόζης. Τα Allele I, παρουσία (Insertion) του τμήματος των 287bp (490bp) και το Allele D, απουσία (Deletion) του τμήματος των 287bp (190bp). Διακρίνονται στη εικόνα πάνω δεξιά στη θέση 1 ο II γονότυπος, στις θέσεις 2 και 3 ο DI γονότυπους και στις θέσεις 4 και 5 ο DD γονότυπος.

Πολύ ενδιαφέρον εύρημα είναι 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 [191]. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός επίδρασης των πολυμορφισμών ACE στην έκβαση ασθενών με ΚΕΚ παραμένει άγνωστος, υποστηρίζεται ότι η διαταραχή της ροής του αίματος στον εγκέφαλο και/ή η αυτορρύθμιση της πίεσης του αίματος πιθανό να επηρεάζουν την σύσπαση των εγκεφαλικών αγγείων και την εγκεφαλική βλάβη μετά από ισχαιμία και ακόμη στην αναστολή της συσσώρευσης του Αβ αμυλοειδούς, ενός κυτταροτοξικού παράγοντα [192]. Μελέτες έδειξαν ότι ο I/D πολυμορφισμός παίζει σημαντικό ρόλο στα επίπεδα έκφρασης του ACE ενζύμου στο πλάσμα αλλά και στους ιστούς [181,196] Έχει παρατηρηθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των D αλληλομόρφων και της συγκέντρωσης της BK1-5 (το ανενεργό προϊόν), και της αναλογίας BK1-5/βραδυκίνη in vivo [128]. Η εντόπιση του πολυμορφισμού αυτού όμως σε μη-κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου καθιστά λιγότερο πιθανό το ενδεχόμενο να πρόκειται για έναν λειτουργικό πολυμορφισμό. Η ακριβής θέση του λειτουργικού πολυμορφισμού στο γονίδιο του ACE ενζύμου δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί [132].

Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης (ACE)

Η πρωτεΐνη ACE και λειτουργία της

Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης (ACE: Angiotensin Converting Enzyme) είναι μια μεταλλοπεπτιδάση ψευδαργύρου (Zn). Ανευρίσκεται στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων όπως: ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα, κύτταρα των λείων μυϊκών ινών και λιποκύτταρα και επιπλέον υπάρχει μια αρχέγονη μορφή του ACE που συναντάται στους όρχεις κατ' αποκλειστικότητα. Από τη διάσπαση της μεμβρανικής μορφής με τη βοήθεια της ACE σεκρετάσης (ACE secretase), παράγεται η διαλυτή μορφή του ACE (soluble or plasma ACE και ανευρίσκεται στον ορό, καθώς και σε διάφορα άλλα υγρά του σώματος [169].

Το σύστημα ρενίνης -αγγιοτενσίνης

Το σύστημα ρενίνης-αγγιοτενσίνης-αλδοστερόνης, συμβάλλει στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και του όγκου του πλάσματος. Τα παρασπειραματικά κύτταρα των νεφρών παράγουν τη ρενίνη, η οποία διασπά το μη-ενεργό πεπτιδίο του αγγιοτενσινογόνου, του οποίου η σύνθεση λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, και παράγεται με αυτό τον τρόπο η αγγιοτενσίνη-I (Ang I), η οποία και είναι μια μη-ενεργή πρωτεΐνη των αγγείων. Εν συνέχεια, το μη-ενεργό μόριο της Ang I (ή Ang1-10) μετατρέπεται μέσω του ACE στο ενεργό οκταπεπτιδίο της αγγιοτενσίνης-II Ang II (ή Ang1-8) [170].

Δράσεις αγγιοτενσίνης-II

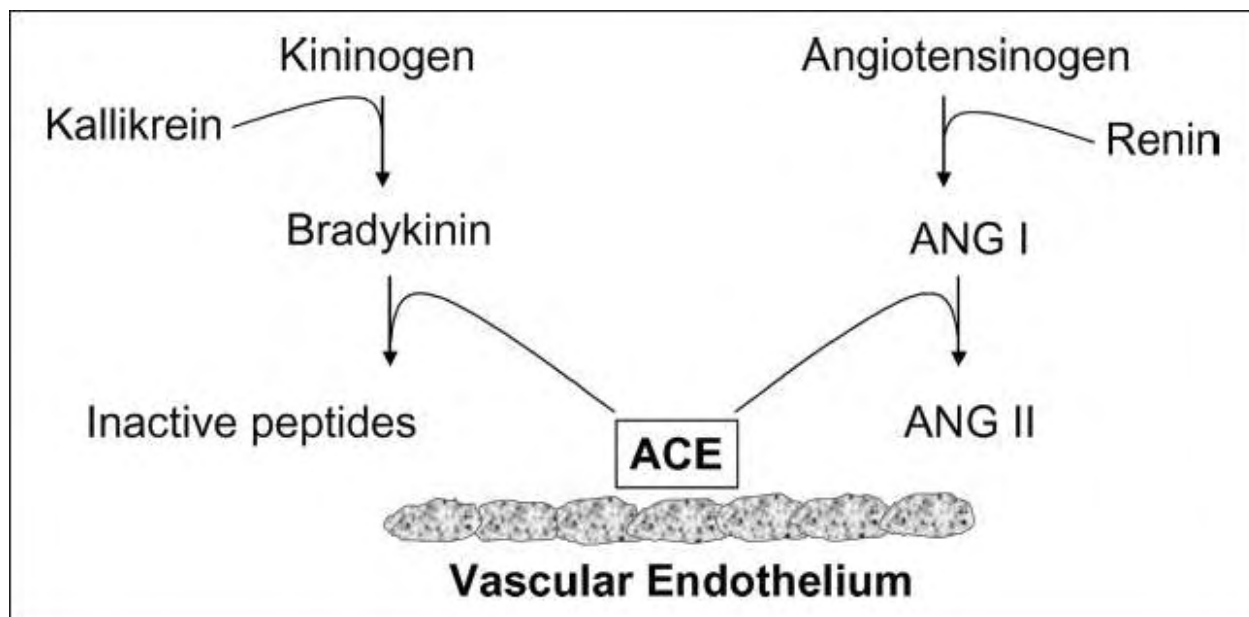
Συνοπτικά οι δράσεις της αγγιοτενσίνης-II είναι οι εξής:

- 1.συστολή των αγγείων
- 2.απελευθέρωση της αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια που οδηγεί επαναρρόφηση Na^+ και H_2O από τα ούρα και αύξηση της αρτηριακής πίεσης [171]
- 3.επαγωγή σύνθεσης κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων προς ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων [172]
- 4.πιθανή συμβολή στη δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του νιτρικού οξέος [173].

Το σύστημα της κινίνης- καλλικρεΐνης

Το μονοπάτι της κινίνης-καλλικρεΐνης (kinin-kallikrein cascade) αποτελεί ένα σύστημα ορμονών που συμμετέχει το ACE συμβάλλοντας έτσι και μέσω αυτού στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Πιο συγκεκριμένα η βραδυκινίνη, που προκαλεί και διαστολή των αγγείων

μεταβολίζεται από το ACE και εν συνεχεία, και σχηματίζεται ο μη-ενεργός μεταβολίτης της βραδυκινίνης 1-5.

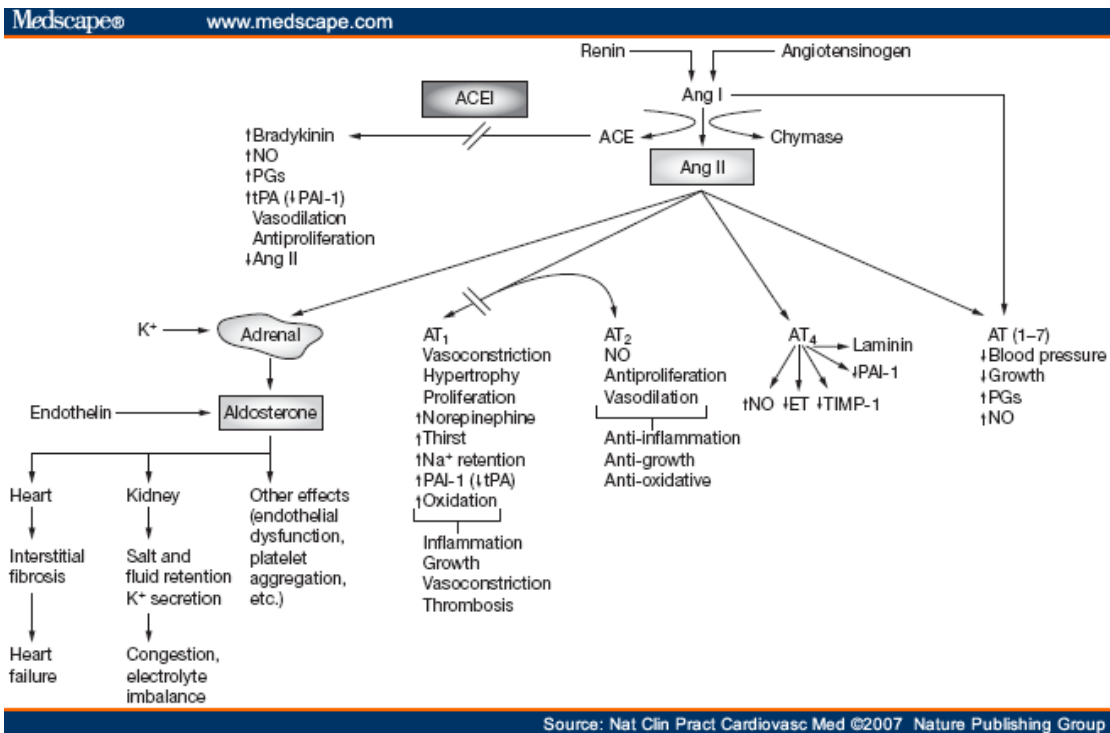


Εικόνα 18. Το σύστημα κινίνης-καλλικρεΐνης (αριστερά) και το σύστημα ρενίνης-αλδοστερόνης (δεξιά)

Ο ρόλος του ACE σε παθήσεις του ΚΝΣ

Έχει βρεθεί ότι το ACE εμπλέκεται στη ρύθμιση των νευροκινών (neurokinins). Οι νευροκίνες είναι μια οικογένεια νευροδιαβιβαστών του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) που συμμετέχουν στη μεταβίβαση της αίσθησης του πόνου, τη ρύθμιση των συναισθημάτων, την μετατροπή των φλεγμονωδών και ανοσοποιητικών αποκρίσεων [174, 175]. Παρόλα αυτά, δεν είναι πάντοτε εφικτή in vivo, η μελέτη της δράσης του ACE στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών αυτών [176]. Διάφορες νευρολογικές παθήσεις, όπως η νόσος του Parkinson (PD) [177], η κατάθλιψη [178], και άλλες συναισθηματικές διαταραχές [179] έχουν μελετηθεί σε σχέση με το ACE. Το β-αμυλοειδές φαίνεται ότι διασπάται από ACE ένζυμο σε in vitro μελέτες [180], το οποίο β-αμυλοειδές εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer (AD). Επομένως, ίσως, αν το ACE βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα, να παρεμποδίζεται ο σχηματισμός των γεροντικών πλακών οι οποίες παρατηρούνται στην AD. Πολύ σημαντικό επίσης αποτελεί το εύρημα, πως αυξημένες συγκεντρώσεις του ACE ενζύμου έχουν βρεθεί στη μελανοραβδωτή οδό και στα βασικά γάγγλια [213].

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται, το σύστημα ρενίνη-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, καθώς και οι δράσεις της αγγειοτενσίνης II, όπου μπορεί κάποιος σχηματικά να κατανοήσει τις λειτουργίες της.



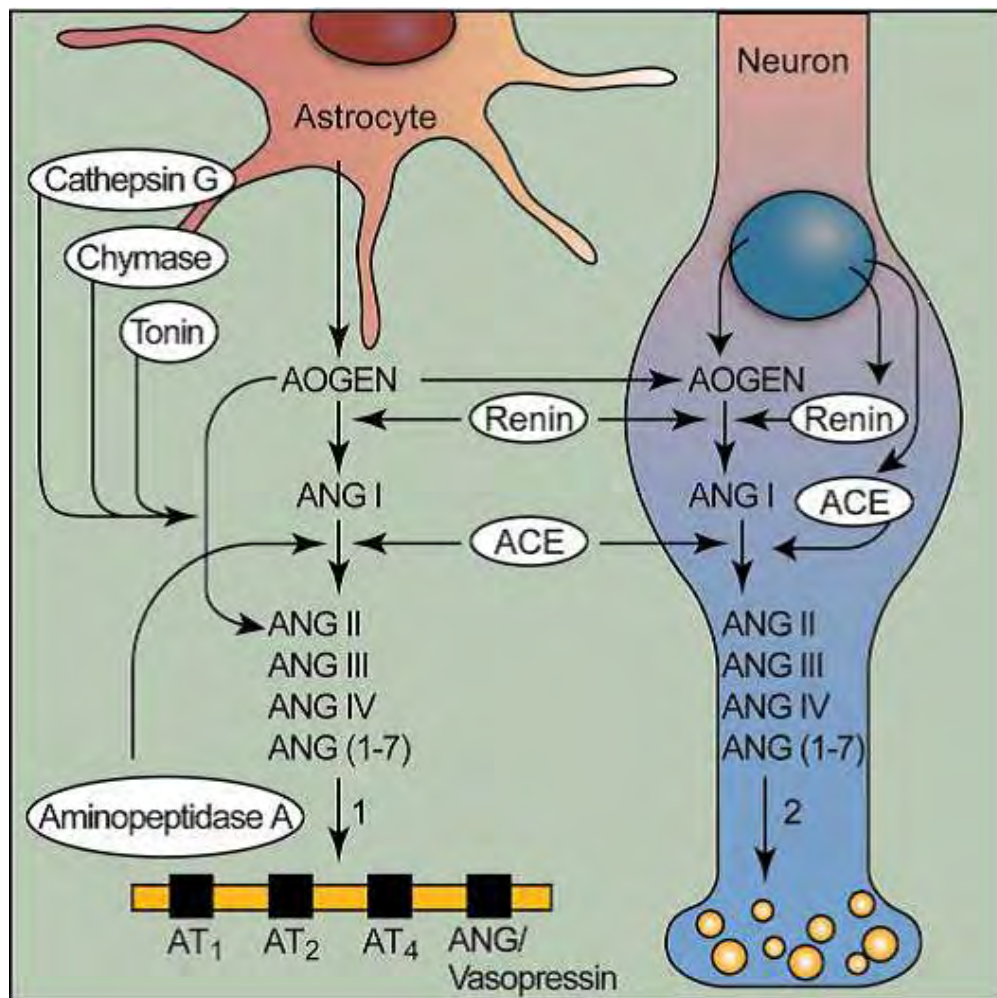
Εικόνα 19. Στην εικόνα παρουσιάζεται αδρά ο μηχανισμός παραγωγής της αγγιοτενσίνης και γενικότερα το σύστημα της ρενίνης-αγγιοτενσίνης-αλδοστερόνης καθώς και η δράση της αγγιοτενσίνης-II (Ang-II).

Το σύστημα ρενίνης-αλδοστερόνης στο ΚΝΣ

Εκτός από την περιγραφείσα κλασσική οδό του RAS, όλα τα απαραίτητα μόρια που είναι απαραίτητα για να συνθέσει η αγγιοτενσίνη-II εκφράζονται επίσης τοπικά και σε άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου, του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος, του λιπώδους ιστού, του λεμφικού ιστού, της καρδιάς, των αγγείων, του δέρματος, του αναπαραγωγικού συστήματος, του πεπτικού συστήματος, καθώς και αισθητήρια όργανα, όπως ο οφθαλμός και ο κοχλίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχουν επίσης και τοπικά RASs, όχι όμως αποκομμένα λειτουργικά [218]. Η ιδέα αυτή βασίζεται σε ευρήματα των συστατικών του RAS σε μη συνηθισμένα μέρη (όπως της ρενίνης ένα «ένζυμο των νεφρών» στον εγκέφαλο), όπου οι ενδοκρινείς δράσεις του συστήματος, δεν θα μπορούσε να εξηγήσει τα ευρήματα [67, 68]. Παρόλη τη διαμάχη γύρω από το θέμα αυτό, η υπόθεση των local RASs ενισχύεται σε μεγάλο βαθμό από δύο σημαντικές τεχνικές προόδους, δηλαδή, τη χρήση της μοριακής βιολογίας και τα διαγονιδιακά και knock-out μοντέλα, με τροποποιημένη έκφραση των συστατικών του RAS. Δύο είναι οι πιθανοί υπό διερεύνηση τρόποι παραγωγής αγγιοτενσίνης-II εντός του ΚΝΣ:

1) η εξωκυττάρια παραγωγή του πεπτιδίου της αγγιοτενσίνης-II, που ενεργεί ως νευρο-ορμόνη και

2) η πρόσληψη του αγγειοτενσινογόνου από τους νευρώνες και σχηματισμός του πεπτιδίου της αγγειοτενσίνης-II εντός του νευρώνα. Η αγγειοτενσίνη-II σε αυτό το μοντέλο δρα ως νευροδιαβιβαστής ή ως συνεργικό μόριο στη νευροδιαβίβαση [201].



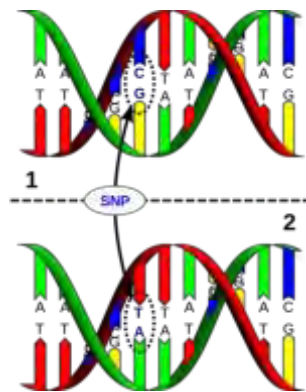
Εικόνα 20. Το σύστημα ρενίνης-αλδοστερόνης στο ΚΝΣ.

Οι δύο πιθανοί τρόποι παραγωγής ANG II εντός του ΚΝΣ είναι: 1) η εξωκυτάρια παραγωγή του πεπτιδίου της αγγειοτενσίνης-II, που ενεργεί ως νευρο-ορμόνη και 2) η πρόσληψη του αγγειοτενσινογόνου από τους νευρώνες και σχηματισμός του πεπτιδίου της αγγειοτενσίνης-II εντός του νευρώνα. Η Ang-II σε αυτό το μοντέλο δρα ως νευροδιαβιβαστής ή ως συνεργικό μόριο στη νευροδιαβίβαση. Αριστερά απεικονίζεται η πρώτη υπόθεση, σύμφωνα με την οποία γίνεται η εξωκυτάρια παραγωγή της ANG II [(καθώς και των ANG III, ANG IV, ANG (1-7)] από το Aogen (αγγειοτενσινογόνο) με τη δράση αρχικά της Renin (ρενίνης) για παραγωγή ANG I και εν συνεχεία του ACE. Επιπλέον φαίνεται η δράση αυτών μέσω των υποδοχέων [AT₁, AT₂, AT₄, ANG/(Vasopresin)]. Ακόμη κάποιος μπορεί να παρατηρήσει πιθανά ένζυμα που μπορεί να εμπλέκονται στην παραγωγή ANG II όπως είναι οι tonin (τονίνη), cathepsin G (καθεψίνη G) και η chymase (χυμάση). Δεξιά βλέπουμε την δεύτερη υπόθεση. Παρατηρούμε την πρόσληψη του Aogen από τον νευρώνα και την παραγωγή εντός αυτού της ANG II [(καθώς και των ANG III, ANG IV, ANG (1-7)] πάλι μέσω της Renin και του ACE. [201] Ανατύπωση από: Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006;86 (3):747–803 [218].

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs)

Γενικά

Πολυμορφισμός (polymorphism) είναι η γενετική διαφοροποίηση σε ένα γενετικό τόπο που δε σχετίζεται άμεσα με την εκδήλωση μιας νόσου. Ένας πολυμορφισμός συμβαίνει όταν διαφορετικά άτομα έχουν πολλές γενετικές παραλλαγές στην ίδια θέση (loci) των γονιδιωμάτων τους. Αν μόνο ένα νουκλεοτίδιο έχει αλλάξει, η παραλλαγή ονομάζεται SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Δηλαδή στους πολυμορφισμούς απλού νουκλεοτιδίου (SNP) υπάρχει αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου με ένα άλλο.



Εικόνα 21. Το μόριο DNA 1 διαφέρει από το μόριο DNA 2 σε μία μόνο θέση ως προς ένα ζεύγος βάσεων (ένας πολυμορφισμός SNP C / T).

Στην περίπτωση αυτή, έχουμε συνήθως δύο δυνατότητες για κάθε τόπο, για παράδειγμα αλλάζοντας το T με C ($T \rightarrow C$). Στην προηγούμενο παράδειγμα, υπάρχουν τρεις δυνατοί γονότυπους: T / T, T / C και C / C. Αν τα δύο αλληλόμορφα είναι πανομοιότυπα (T / T ή C / C εν προκειμένω) λέμε το άτομο είναι ομόζυγο. Αλλιώς, το άτομο θα είναι ετερόζυγο. Ανάλογα με τη θέση εντοπισμού ενός SNP, μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικό αποτέλεσμα. Ένας SNP μπορεί να συμβεί:

1. είτε σε μια κωδικοποιούμενη περιοχή του γονιδίου (exons)
2. είτε σε μη κωδικοποιούμενες περιοχές (όπως introns ή 3'-UTR),
3. είτε τέλος στους υποκινητές των γονιδίων (promoters).

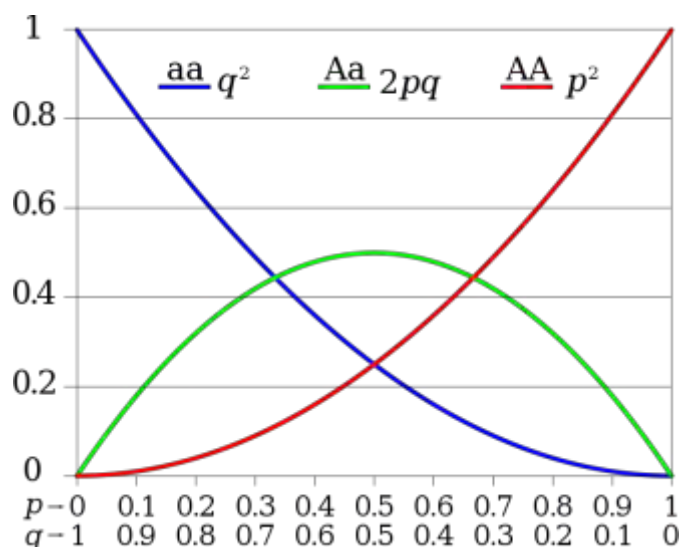
SNP τώρα σε μια κωδικοποιούμενη περιοχή του γονιδίου, έχει ως συνέπεια είτε αλλαγή του νουκλεοτιδίου της πρωτεΐνης (non-synonymous polymorphism) είτε όχι (synonymous polymorphism). Αν οι SNPs εντοπίζονται σε μη κωδικοποιούμενες περιοχές (πχ introns, 3'-UTR), μπορεί και αυτοί με τη σειρά τους να επηρεάσουν τη λειτουργία του γονιδίου (πχ το RNA μάτισμα κατά τη δημιουργία του m-RNA). Όταν ο SNP εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων (promoters), επιδρά άμεσα στη γονιδιακή ρύθμιση.

Ο νόμος Hardy-Weinberg

Ο νόμος Hardy-Weinberg έχει δύο βασικά χαρακτηριστικά:

1. ανάμεσα στη συχνότητα των αλληλομόρφων και της συχνότητας των γονοτύπων σε ένα πληθυσμό (υπό συγκεκριμένες και ιδανικές συνθήκες) υπάρχει μία απλή σχέση μεταξύ της συχνότητας των αλληλομόρφων και της συχνότητας των γονοτύπων σε ένα πληθυσμό. Οι συνθήκες αυτές είναι ο μεγάλος πληθυσμός και τυχαίες συζεύξεις στον υπό μελέτη γενετικό τόπο. Επειδή ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης δεν είναι σημαντικός, υπάρχει η ίδια ικανότητα μεταξύ των ατόμων όλων των γονοτύπων για αναπαραγωγή και μεταβίβαση των γονιδίων και επειδή τα άτομα που εισέρχονται σε ένα πληθυσμό, δεν έχουν πολύ διαφορετικές συχνότητες αλληλομόρφων από τον πληθυσμό αυτό, οι συχνότητες αυτών παραμένουν σταθερές στο χρόνο.
2. εάν δεν υπάρχει μεταβολή στις συχνότητες των αλληλομόρφων, οι αναλογίες των γονοτύπων θα παραμένουν σταθερές από γενιά σε γενιά,.

Αν υποθέσουμε ότι η συχνότητα ενός αλληλομόρφου A είναι p και πως η συχνότητα του αλληλομόρφου a q, και ακόμη πως τα αλληλόμορφα συνδυάζονται τυχαία στους γονοτύπους, τότε η πιθανότητα να προκύψει ο γονότυπος AA είναι p^2 , ο Aa είναι $2pq$ και aa είναι q^2 . Αυτή είναι η πιο απλή περίπτωση, ενός γενετικού τόπου, με δύο εναλλακτικά αλληλόμορφα ($n=2$ και $p+q=1$). Ο νόμος Hardy-Weinberg δηλώνει ότι οι συχνότητες των τριών γονοτύπων AA, Aa και aa μπορούν να υπολογιστούν βάση της διωνυμικής κατανομής $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$. Για έναν γενετικό τόπο με n αλληλόμορφα, με αντίστοιχες συχνότητες το καθένα p_1, p_2, \dots, p_n , η συχνότητα των γονοτύπων μπορεί να υπολογιστεί από την ανάπτυξη του τύπου $(p_1+p_2+\dots+p_n)^2$ [197].



Εικόνα 22. Στην εικόνα φαίνονται η Hardy-Weinberg αναλογίες για δύο αλληλόμορφα A και a. Ο οριζόντιος άξονας δείχνει τις συχνότητες των δύο αλληλομόρφων p και q και ο κατακόρυφος άξονας δείχνει τις αναμενόμενες συχνότητες στον γονότυπο. Κάθε γραμμή δείχνει έναν από τους τρεις πιθανούς γονοτύπους.

Ισορροπία και ανισορροπία γενετικής σύνδεσης

Σε έναν πληθυσμό, όταν η συχνότητα κάθε αλληλομόρφου στους απλότυπους είναι ίση με τη συχνότητα του αλληλομόρφου στον πληθυσμό τότε τα αλληλόμορφα βρίσκονται σε ισορροπία γενετικής σύνδεσης (Linkage Equilibrium: LE). Οι απλότυποι που δεν βρίσκονται σε ισορροπία γενετικής σύνδεσης, βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium: LD) . Η γενετική ανισορροπία σύνδεσης είναι η μη τυχαία ένωση αλληλομόρφων σε δύο ή περισσότερους τόπους (loci). Δηλαδή είναι η εμφάνιση ορισμένων συνδυασμών αλληλομόρφων ή γενετικών δεικτών σε έναν πληθυσμό πιο συχνά ή λιγότερο συχνά από ό, τι θα αναμενόταν από ένα τυχαίο σχηματισμό των απλοτύπων από αλληλόμορφα με βάση τις συχνότητές τους. Με άλλα λόγια, αν δύο αλληλόμορφα βρίσκονται σε σύνδεση ισορροπίας, αυτό σημαίνει ότι αυτά κληρονομούνται εντελώς ανεξάρτητα σε κάθε γενεά. Αν όμως δύο γονίδια είναι σε ανισορροπία σύνδεσης, αυτό σημαίνει ότι ορισμένα αλληλόμορφα του κάθε γονιδίου κληρονομούνται μαζί πιο συχνά από ό, τι θα αναμενόταν στην τύχη.

Τα D' (Lewontin's D') και r^2 (correlation coefficient) είναι τα δύο σημαντικότερα μέτρα εκτίμησης της ανισορροπίας σύνδεσης (LD) και χρησιμοποιούνται και στο HarMap project. Το D είναι η απόκλιση μεταξύ της αναμενόμενης συχνότητας ενός απλότυπου (με την παραδοχή της μη ύπαρξης σχέσης) και της παρατηρούμενης συχνότητας αυτού. Αν για παράδειγμα, για δύο SNPs (A και B) με συχνότητες αλληλίων p_A, p_a, p_B, p_b και συχνότητα του απλότυπου AB είναι p_{AB} τότε $D = p_{AB} - p_A p_B$ και $D' = |D/D_{max}|$. Όπου D_{max} είναι το μικρότερο από τα $p_A p_b$ ή $p_a p_B$ αν το D είναι θετικό και το μικρότερο από τα $p_A p_B$ ή $p_a p_b$ αν το D είναι αρνητικό. Το r^2 υπολογίζεται ως εξής: $r^2 = D^2 / [p_A(1 - p_A)p_B(1 - p_B)]$. Αν $D' = 1$ τότε έχουμε πλήρη (complete) LD, όταν το $r^2 = 1$ τότε έχουμε τέλεια (perfect) LD και όταν $r^2 = 0$ τότε έχουμε τέλεια ισορροπία σύνδεσης (LE-Linkage Equilibrium).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Συσσωρευμένα στοιχεία από πολλές μελέτες δείχνουν ότι η έκταση των τραυματισμών του εγκεφάλου και το κλινικό αποτελέσματα μετά από κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις (ΚΕΚ) διαμορφώνονται, σε κάποιο βαθμό, από γενετικές παραλλαγές [70, 204]. Οι γνωστοί παράγοντες κινδύνου δεν μπορούν να εξηγήσουν πλήρως την έκβαση μιας ΚΕΚ, με πολλές μελέτες να εστιάζουν ολοένα και περισσότερο στην εμπλοκή γενετικών παραγόντων στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ και μάλιστα φαίνεται πως η βλάβη στον εγκέφαλο μετά από ΚΕΚ και η πορεία αυτής να επηρεάζεται από γενετικούς πολυμορφισμούς. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει πιθανή συσχέτιση πολυμορφισμών του γονιδίου του ACE και την αρχικής σοβαρότητας της ΚΕΚ σε ασθενείς που είχαν υποστεί ΚΕΚ καθώς και την μακροπρόθεσμη κλινική έκβαση αυτών μετά από ΚΕΚ. Εμείς προσπάθησε να διερευνήσουμε την επίδραση του γονιδίου του ACE στην έκβαση των ασθενών μετά από ΚΕΚ, μελετώντας (SNPs) του γονιδίου ACE. Ένα σύνολο από 363 ασθενείς με ΚΕΚ (19,6% γυναίκες) συμμετείχαν στη μελέτη αυτή. Δεδομένα συμπεριλαμβανομένης ηλικίας, του φύλου, της Κλίμακας Γλασκώβης (GCS) κατά την είσοδο στο νοσοκομείο, η ύπαρξη ή όχι αιμορραγικού συμβάντος (αιμορραγική θλάση, υπαραχνοειδής αιμορραγία, επισκληρίδιο αιμάτωμα, υποσκληρίδιο αιμάτωμα, ενδοκοιλιακή αιμορραγία και ενδοεγκεφαλική αιμορραγία) καθώς και η μετά από 6-μήνες Κλίμακα Έκβασης Γλασκώβης (GOS) συλλέχθηκαν. Πέντε SNPs πολυμορφισμοί του γονιδίου ACE προσδιορίστηκαν με βάση τα δεδομένα HarMap από τον TSI (Tuscan in Italy) πληθυσμό (Release 27, Phase II+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126):

1.rs4343,

2.rs4461142,

3.rs7221780,

4.rs8066276,

5.rs8066114

Αυτοί οι πολυμορφισμοί ελέγχθηκαν για συσχετίσεις ως προς την μετά από 6 μήνες Κλίμακα έκβασης Γλασκώβης (GOS), μετά την προσαρμογή ως προς την ηλικία, το φύλο και την Κλίμακα Γλασκώβης (GCS).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Ασθενείς με ΚΕΚ επιλέχθηκαν προοπτικά μετά από διαδοχικές εισαγωγές στο τμήμα Νευροχειρουργικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας [205, 206]. Κριτήρια επιλογής

ήταν ο ασθενής να φέρει αμβλύ τραύμα στο κεφάλι, να είναι ελληνικής καταγωγής και να είναι 18 ετών ή μεγαλύτερος. Ασθενείς με διαττραίνουσα ΚΕΚ, βλάβες πολλαπλών οργάνων ή ανοξική εγκεφαλική βλάβη αποκλείστηκαν. Συνολικά 363 ασθενείς με ΚΕΚ συμμετείχαν στο μελέτη. Το πρωτόκολλο της μελέτης εξετάστηκε και εγκρίθηκε από το δικό μας Institutional Review Board και λεπτομερή έγγραφη συγκατάθεση λήφθηκε από κάθε συμμετέχοντα (ή από στενό συγγενή σε περίπτωση που δεν ανταποκρινόταν ή ήταν σε κωματώδη κατάσταση ο ασθενής).

Όσον αφορά την καταγραφή των ασθενών, για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε τα εξής:

1. Δημογραφικά δεδομένα (όπως η ηλικία και το φύλο των συμμετεχόντων) και δεδομένα που σχετίζονται με την ΚΕΚ (όπως η σοβαρότητα του αρχικού τραυματισμού, τα πορίσματα της αρχικής αξονική τομογραφία και 6 μηνών κλινική έκβαση συλλέχθηκαν επίσης προοπτικά).

2. Πραγματοποιήθηκε νευρολογική εκτίμηση και η κλινική σοβαρότητα του τραυματισμού της κεφαλής κατά την εισαγωγή του ασθενούς μετρήθηκε με τη βοήθεια της κλίμακας κώματος Γλασκώβης (GCS). Η GCS παρότι όπως αναφέρεται πιο πάνω παίρνει τιμές από 3 έως 15 διαιρέθηκε ώστε να δημιουργηθούν τρεις κατηγορίες. Οι ασθενείς κατανεμήθηκαν σε μία από τις ακόλουθες τρεις κατηγορίες με βάση την βαθμολογία του καθενός στην GCS:

A. σοβαρή ΚΕΚ (GCS = 3-8),

B. μέτρια (GCS = 9-12) και

Γ. ήπια ΚΕΚ (GCS = 13-15).

3. Έγινε καταγραφή ευρημάτων των απεικονιστικών ελέγχων (αξονικής ή μαγνητικής τομογραφίας) για ύπαρξη ή όχι των παρακάτω:

A. αιμορραγική θλάση,

B. υπαραχνοειδής αιμορραγία,

Γ. υποσκληρίδιο αιμάτωμα,

Δ. υποσκληρίδιο αιμάτωμα

E. ενδοεγκεφαλική αιμορραγία

ΣΤ. ενδοκοιλιακή αιμορραγία

4. Απομόνωση γενωμικού DNA από πυρήνες λευκοκυττάρων, έπειτα από αιμοληψία (μετά από έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών) με τη μέθοδο εξαλάτωσης η οποία και περιγράφεται λεπτομερώς στη συνέχεια.

5. Έξι μήνες μετά από την ΚΕΚ οι περισσότεροι από τους ασθενείς επανεκτιμήθηκαν στα εξωτερικά ιατρεία της νευροχειρουργική κλινικής. Για 54 ασθενείς (14,8%) οι πληροφορίες που λήφθηκαν μέσω τηλεφώνου από τους ίδιους ή τους φροντιστές τους ασθενείς. Σε σχέση με το λειτουργικό βαθμό αποκατάστασης μετά από την ΚΕΚ, οι ασθενείς κατανεμήθηκαν σε μία από τις 2 ακόλουθες κατηγορίες της Κλίμακας Έκβασης Γλασκώβης (GOS) από εξεταστή ο οποίος δεν γνώριζε την αρχική GCS κατά την εισαγωγή και τα αποτελέσματα του γενετικού ελέγχου. Για τις αναλύσεις, η 2 κατηγορίες που προέκυψαν με διχοτόμηση της GOS ήταν:

A. καλή [καλή ανάρρωση (G), μέτρια αναπηρία (MD)] και

B. κακή [σοβαρή αναπηρία (SD), φυτική κατάσταση (V), θάνατος (D)],

ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μία δυαδική μεταβλητή που να αντιστοιχεί σε λειτουργική ανεξαρτησία ή όχι του ασθενούς αντίστοιχα [207, 208].

Επιλογή πολυμορφισμών

Οι αντιφάσεις μεταξύ των μελετών θα μπορούσαν ενδεχομένως να εξηγηθούν από το γεγονός ότι η ο πολυμορφισμός I/D του ACE μπορεί να μην αντιπροσωπεύει λειτουργική παραλλαγή του γονιδίου. Υπάρχουν αναφορές ότι μεταβάλλει την μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου ACE [151] και ρυθμίζει το επίπεδα στο πλάσμα και την τοπική παραγωγή των ACE και αγγειοτενσίνης-II [181, 196, 240], όμως παρά τις σημαντικές προσπάθειες, η ακριβής θέση του λειτουργικού πολυμορφισμού του γονιδίου του ACE παραμένει ακόμα άγνωστη. Παραμένει αβέβαιο κατά πόσο ο λειτουργικό πολυμορφισμό βρίσκεται γύρω από τον I/D ή εάν υπάρχουν περισσότερες από μία περιοχές που ελέγχουν τα επίπεδα ACE [132]. Για να αντιμετωπίσουμε αυτό το πρόβλημα και σε μια προσπάθεια να καλύψουμε το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής ποικιλότητας όλου του γονιδίου ACE (μια περιοχή μεγέθους 37.03 kbp στο chr17: 58915909.58952935), τα προς μελέτη SNPs εντοπίστηκαν στο project HarMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) με το πρόγραμμα (<http://www.broadinstitute.org/mpg/tagger>). Η επιλογή των SNPs βασίστηκε στον πληθυσμό Tuscan in Italy, HarMap-TSI (Release 27, Phase II+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126) χρησιμοποιώντας τα παρακάτω κριτήρια: r^2 μεγαλύτερο ή ίσο με 0,8 και συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου μεγαλύτερη από 0,05. Συνολικά πέντε SNPs επιλέχθηκαν, τα οποία καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της μεταβλητότητας του γονιδίου ACE στην βάση δεδομένων HarMap. Τα SNPs που

επιλέχθηκαν είναι rs4343, rs4461142, rs7221780, rs8066276, rs8066114 και λεπτομέρειες για αυτά φαίνονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Γονοτυπικά χαρακτηριστικά των πολυμορφισμών του γονιδίου του ACE που μελετήθηκαν (στον πληθυσμό HarMap-TSI (Release 27, Phase II+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126)

Πολυμορφισμός	Χρωμοσωμική θέση	Γονιδιακή θέση	Λειτουργία	Minor Αλληλόμορφο (Συχνότητα)
1.rs4343	58919763	εξόνιο 16	Coding synonymous	G(0.648)
2.rs4461142	58931780	ιντρόνιο 23	No coding	T (0.631)
3.rs7221780	58941858	εξόνιο 24	No coding	C (0.307)
4.rs8066276	58942997	ιντρόνιο 24	No coding	T (0.261)
5.rs8066114	58943572	ιντρόνιο 24	No coding	G (0.471)

Εργαστηριακές τεχνικές

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται οι μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στο Εργαστήριο Νευρογενετικής της Νευρολογικής Κλινικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της εν λόγω μελέτης. Για την καλύτερη κατανόηση της μεθόδου Taqman γίνεται περιγραφή και των PCR και real-time PCR. Οι τεχνικές λοιπόν είναι οι εξής:

1. Απομόνωση DNA
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)
3. PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)
4. Γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman

Απομόνωση DNA

Στο συγκεκριμένο πείραμα εφαρμόστηκε η μέθοδος της εξαλάτωσης. Είναι σημαντικό το DNA να είναι ελεύθερο προσμίξεων και να μην είναι διασπασμένο σε πολύ μικρά κομμάτια που δεν μπορούν να ενισχυθούν και να αναλυθούν. Η απομόνωση γενωμικού DNA γίνεται από εμπύρνηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (πυρήνες λευκοκυττάρων). Για τη διαδικασία αυτή λαμβάνονται 10ml αίματος που τοποθετούνται σε σωληνάριο, παρουσία αντιπηκτικού

Na₂EDTA. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του γενωμικού DNA είναι:

1) Διάλυμα διάσπασης των πυρήνων [Lysis I: NH₄Cl (155mM), KHCO₃ (10mM), EDTA (1mM), pH=7.4 και Lysis II : Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na EDTA (2mM), pH=8.2],

2) διάλυμα πρωτεΐνάσης K (10mg/ml),

3) Διάλυμα 10% w/v SDS (sodium dodecyl sulfate: δωδεκακυλοθειικό νάτριο),

4) κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M),

5) απόλυτη αιθανόλη,

6) CH₃COONa (3M),

7) πηκτή αγαρόζης 1%

Για την απομόνωση του DNA με τη μέθοδο της εξαλάτωσης ακολουθούμε τα παρακάτω στάδια παρουσιάζονται παρακάτω:

1η μέρα

1. Τοποθετούμε το αίμα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15ml και αραιώνουμε ως 12ml με ddH₂O (δix αποσταγμένο νερό). Ακολουθεί καλή ανάδευση (με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων).

2. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C (απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων).

3. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία συνεχίζεται με το ίζημα. Τα κύτταρα αραιώνονται σε ddH₂O έως 12ml και ανακινούμε σε vortex.

4. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C.

5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα lysis I μέχρι τα 12ml.

6. Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C.

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 πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) (το SDS είναι ένα ανιονικό αποδιατακτικό που δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει τη δομή της μεμβράνης του πυρήνα, ενώ συμμετέχει στην αποδιάταξη της χρωματίνης και των πρωτεϊνών. Επίσης, με την πρωτεΐνάση K επιτυγχάνεται η διάσπαση και η πέψη των πρωτεϊνών, με τις οποίες είναι συνδεδεμένο το DNA).

10.Επώαση στους 370C για 16-18hrs (overnight-O/N).

2η μέρα

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

1.Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C.

2.Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο και απορρίπτουμε το ίζημα. Αναδεύουμε ισχυρά.

3.Φυγοκεντρούμε για 15min στις 3500rpm, στους 40C.

4.Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο των 50ml και απορρίπτουμε το ίζημα.

5.Ακολουθεί καταβύθιση του νουκλεϊκού οξέος, που βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα, με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης (2πλάσιο όγκο σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και 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

6.Επώαση στους 200C O/N.

3η μέρα

1. Φυγοκεντρούμε για 50min στις 3500rpm, στους 40C.
2. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Το DNA που συλλέγεται «ξεπλένεται» με διάλυμα αιθανόλης 70% και εισάγεται σε σωληνάριο τύπου erpendorf (το συγκεκριμένο βήμα καθαρισμού χρειάζεται για την απομάκρυνση του άλατος που έχει παραμείνει στο διάλυμα).
3. Φυγοκεντρούμε για 30min στις 12000rpm, στους 40C.
4. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 2 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρωσης είναι 20min.
5. Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο (αιθανόλη) προσεκτικά, (αφήνουμε μόνο το ίζημα-DNA) και καλύπτουμε το σωληνάριο με παραφίλμ, το οποίο τρυπάμε με μικροσκοπική καρφίτσα (με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η εξάτμιση της αιθανόλης που έχει παραμείνει στο σωληνάριο).
6. Επώαση σε θερμοκρασία ψυγείου.
7. Το DNA φυλάσσεται στους 40C (για συχνή χρήση) ή στους -200C (για μεγάλο χρονικό διάστημα).

Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA

A. Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης

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

B. Μέτρηση συγκέντρωσης

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης του DNA ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Το DNA ανιχνεύεται και προσδιορίζεται ποσοτικά με πολλούς τρόπους. Η απλούστερη μέθοδος περιλαμβάνει τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να απορροφά εκλεκτικά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm.

Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) υδατικού διαλύματος DNA (αραιωμένο διάλυμα DNA 1:100) σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm σε κυβελίδα 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 OD₂₆₀/OD₂₈₀. Τιμές του λόγου μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA, τιμές μικρότερες του 1,7 φανερώνουν ότι το διάλυμα του DNA περιέχει πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA.

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

$$\text{Συγκέντρωση DNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{αραίωση} \times 50 \times \text{τιμή OD}_{260}$$

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)

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός (in vitro) επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου), από ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος γίνεται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction), η οποία ουσιαστικά, εκμεταλλεύεται δύο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA:

1.ότι μονόκλωνο DNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από την Taq DNA πολυμεράση για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου και για το λόγο αυτό καθίσταται απαραίτητη η αποδιάταξη του DNA και

2. ότι για να τη σύνθεση η Taq DNA πολυμεράση χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA, πράγμα που 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).

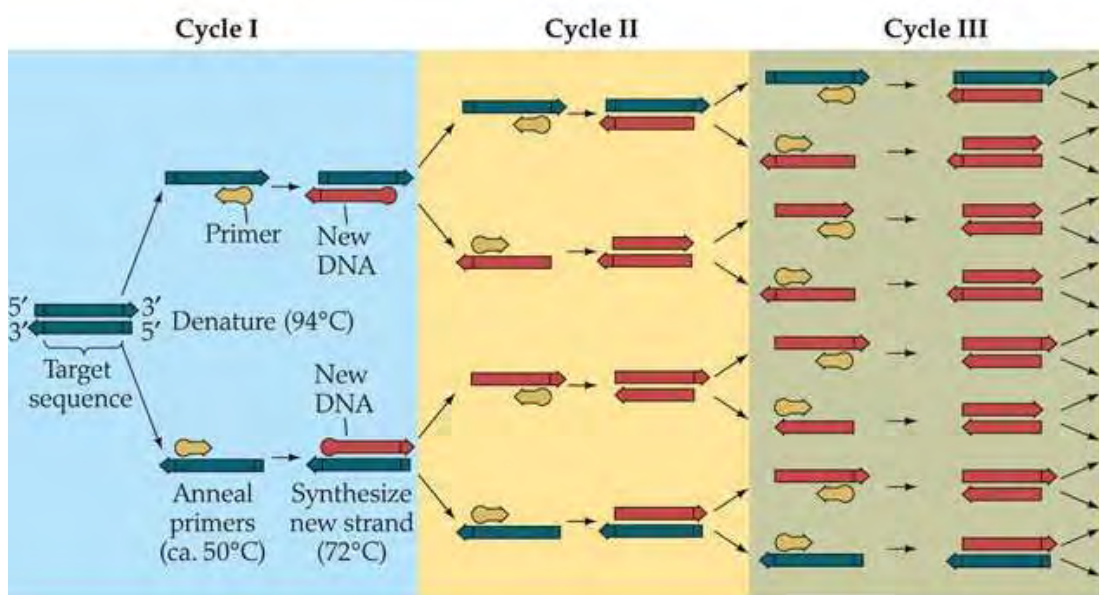
Με επιλογή λοιπόν δύο εκκινητών που υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου (όπου ο κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός προς κάθε μια από τις δύο αλυσίδες DNA και οι δύο μαζί καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος) μπορούμε να ενισχύσουμε οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA. Η τεχνική της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους, όπου ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται εξολοκλήρου in vitro, σε ένα σωληνάριο τύπου erpendorf με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή.

Στάδια των κύκλων της PCR

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

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

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



Εικόνα 23. Στην εικόνα παρατηρείται μία PCR οποία περιλαμβάνει 3 κύκλους (Cycle I, II και III) καθώς και τα στάδια του κάθε κύκλου. Τα τρία αυτά στάδια σημειώνονται ξεχωριστά στον πρώτο κύκλο. Παρατηρούμε το 1ο στάδιο όπου έχουμε τη θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (denaturation). Στη συνέχεια φαίνεται το 2ο στάδιο κατά το οποίο γίνεται η σύνδεση των εκκινητών (primers), όπου οι δύο εκκινητές υβριδίζονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου (primer annealing). Τέλος βλέπουμε το 3ο και τελευταίο στάδιο στο οποίο πραγματοποιείται η σύνθεση DNA, όπου παρουσία Taq DNA πολυμεράσης και dNTPs, οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών με βάση την αλυσίδα DNA-εκμαγείου και οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται (extension). Η σύνθεση DNA γίνεται πάντοτε προς την κατεύθυνση 5'→3'.

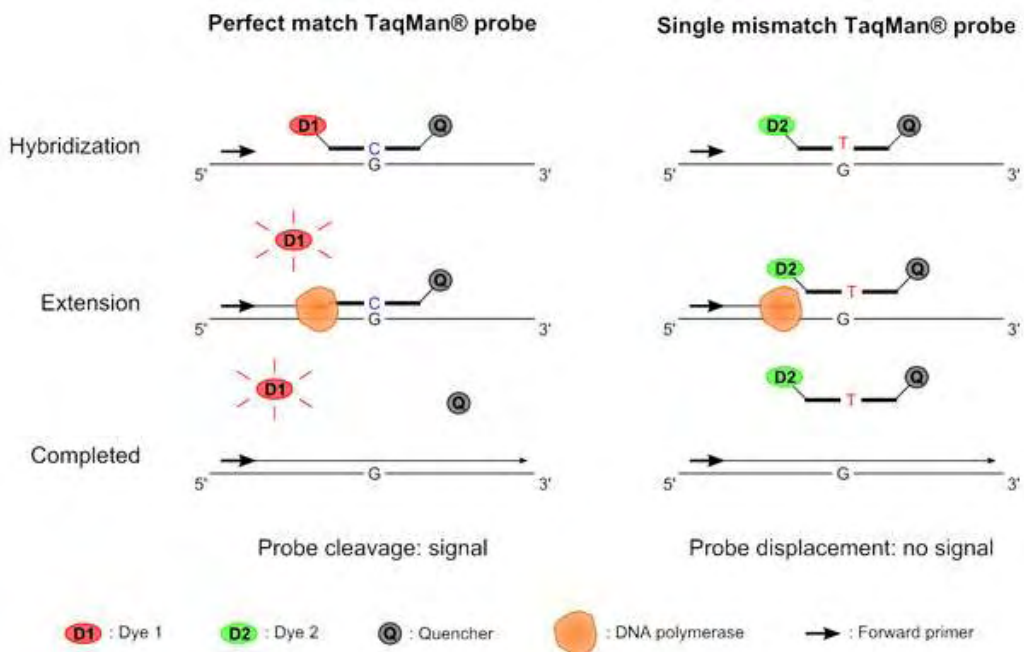
Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει μία επαναλαμβανόμενη εναλλαγή θερμοκρασιών (υψηλή, σχετικά χαμηλή και ενδιάμεση). Αναλυτικότερα, υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, μια σχετικά χαμηλή θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών με συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου και μια ενδιάμεση θερμοκρασία για την επέκταση των εκκινητών.

PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)

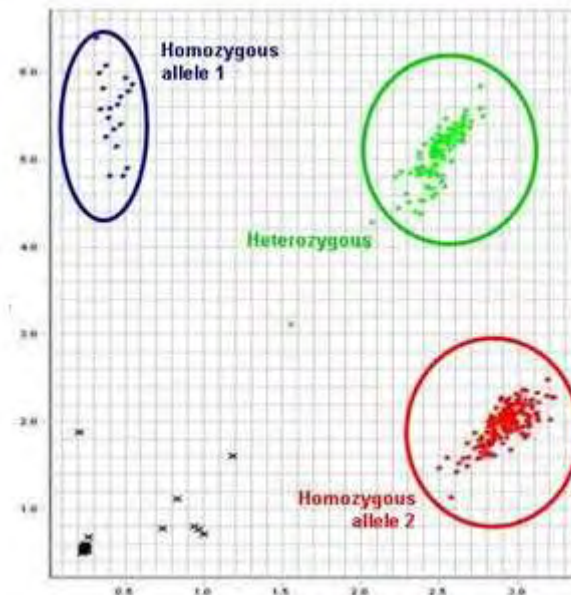
Μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου PCR, είναι η PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR). Με αυτή, μια αλληλουχία-στόχος, μπορεί να ενισχυθεί, να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Η δυνατότητα που παρέχει για παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο και αν βρίσκεται η αντίδραση, επιτρέποντας έτσι ουσιαστικά τη μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος που παράγεται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας, είναι ουσιαστικά το κύριο και μεγάλο πλεονέκτημα της. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του προϊόντος που συντίθεται και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman

Για τον προσδιορισμό πολυμορφισμών σε συγκεκριμένο τμήμα του DNA, χρησιμοποιείται η γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman, η οποία στη ουσία είναι μια Real-Time PCR. Ένας Taqman ιχνηθέτης (ο οποίος είναι συμπληρωματικός με τον υπό έλεγχο πολυμορφισμό) περιέχει δύο χρωστικές. Η μία χρωστική είναι φθορίζουσα και η δεύτερη χρωστική απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από την πρώτη όταν είναι σε εγγύτητα. Αν τώρα, ο υπό εξέταση πολυμορφισμός υπάρχει, ο ιχνηθέτης θα υβριδισθεί στο αντίστοιχο τμήμα του DNA αλλά κατά τη διάρκεια της επέκτασης (extension) του PCR προϊόντος ο ιχνηθέτης θα υδρολυθεί από την Taq πολυμεράση. Συνέπεια αυτού είναι η αποκοπή του άκρου του, και κατ' επέκταση η διακοπή της αλληλεξουδετέρωσης του σήματος, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Αν ο υπό εξέταση πολυμορφισμός δεν υπάρχει, ο ιχνηθέτης θα παραμείνει ανέπαφος και έτσι δεν θα παρατηρηθεί φθορισμός. Με αυτό τον τρόπο και ανάλογα με την ένταση φθορισμού καθίσταται φανερός ο γονότυπος στο συγκεκριμένο σημείο (εικόνες 24, 25). Η γονοτύπωση με τη μέθοδο κατά Taqman πραγματοποιήθηκε σε ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System και η ανάλυση έγινε με το SDS λογισμικό (Applied Biosystems, Foster City, USA).



Εικόνα 24. Στην εικόνα παρατηρούμε γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman. Αριστερά χρησιμοποιείται ένας Taqman ιχνηθέτης που είναι συμπληρωματικός με τον υπό έλεγχο πολυμορφισμό, ο οποίος περιέχει μια χρωστική (D1) που φθορίζει και μια άλλη χρωστική (Q) η οποία απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από την πρώτη όταν είναι σε εγγύτητα. Επειδή υπάρχει ο υπό εξέταση πολυμορφισμός ο ιχνηθέτης υβριδίζεται στο αντίστοιχο τμήμα του DNA αλλά κατά τη διάρκεια της επέκτασης (extention) του PCR προϊόντος ο ιχνηθέτης υδρολύεται από την Taq πολυμεράση, με αποτέλεσμα την αποκοπή του άκρου του, και κατ' επέκταση τη διακοπή της αλληλεξουδετέρωσης του σήματος και την παραγωγή φθορισμού. Αντίθετα δεξιά, ο ιχνηθέτης παραμένει ανέπαφος και έτσι δεν θα παρατηρηθεί φθορισμός. Έτσι ανάλογα με την ένταση φθορισμού καθίσταται φανερός ο γονότυπος στο συγκεκριμένο σημείο.



Εικόνα 25. Γονοτύπηση με τη μέθοδο Taqman: Αποτελέσματα γονοτύπησης ενός συγκεκριμένου SNP με τη μέθοδο Taqman, όπου αναγνωρίζονται οι διάφοροι γονότυποι (ομόζυγος για το αλληλόμορφο 1 δηλαδή 11 με μπλε χρώμα, ετερόζυγος 12 με πράσινο χρώμα και ομόζυγος για το αλληλόμορφο 2 δηλαδή 22 με κόκκινο χρώμα).

Στατιστική ανάλυση

Η ισορροπία Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) αξιολογήθηκε με το Fischer exact test και η σύγκριση των διαφορών μεταβλητών έγινε με τη μέθοδο του χ^2 . Έγινε χρήση the Quanto software (<http://hydra.usc.edu/GxE>, version 1.2.4), το οποίο υπολογίζει το μέγεθος του δείγματος και τη δυναμική των μελετών γενετικής συσχέτισης [193]. Οι τιμές D' και r^2 της ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των SNPs υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>) [195]. Οι λόγοι αναλογιών [Odds Ratios (ORs)] και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης [Confidence Intervals (CIs)] για τους υπό μελέτη **πολυμορφισμούς** υπολογίστηκαν υποθέτοντας διαφορετικά μοντέλα κληρονόμησης τα οποία είναι:

- 1.Επικρατητικό-**Dominant**: [AA] vs [Ab+bb], όπου 2 αντίγραφα του αλληλομόρφου έχουν την ίδιο κίνδυνο με 1 αντίγραφο του.
- 2.Υπολειπόμενο-**Recessive**: [AA+Ab] vs [bb], όπου 1 αντίγραφο του αλληλομόρφου έχει τον ίδιο κίνδυνο με κανένα αντίγραφο του.
- 3.Μοντέλο αντίθεσης αλληλίων-**Allele difference**: [A] vs [b] [209].

Για τον υπολογισμό της στατιστικής σημαντικότητας εφαρμόστηκε η διόρθωση κατά Bonferroni λόγω της διενέργειας πολλαπλών συσχετίσεων με δείκτη σημαντικότητας $P=0.05/5=0.01$ λόγω του ότι μελετήσαμε 5 SNPs. Έτσι, στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν μόνο οι τιμές p που ήταν μικρότερες από 0.01. Όσον αφορά τον μελέτη συσχέτισης για τους **απλότυπους** κατασκευάστηκαν εφτά απλότυποι (TTCCG, CCTC, CTCC, TCTC, TTCC, CCCC,CTCG) οι οποίοι προήλθαν από τους πολυμορφισμούς rs4461142 C/T, rs7221780 T/C, rs8066276 C/T, rs8066114 C/G με τη χρήση των λογισμικών SimHap [194] και SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>) [195], και ελέγχθηκαν για πιθανή συσχέτιση με ευνοϊκή ή δυσμενή έκβαση ασθενών με ΚΕΚ υποθέτοντας το επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης-Dominant. Χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση οι απλότυποι με συχνότητες στο δείγμα μας >0.05 . Για τον υπολογισμό της στατιστικής σημαντικότητας, όσον αφορά τους απλότυπους, εφαρμόστηκε η διόρθωση κατά Bonferroni λόγω της διενέργειας πολλαπλών συσχετίσεων με δείκτη σημαντικότητας $P=0.05/7=0.007$, λόγω του ότι μελετήσαμε 7 απλότυπους. Έτσι, στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν μόνο οι τιμές p που ήταν μικρότερες από 0.007. Τέλος, η στατιστική ανάλυση was performed με το λογισμικό SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δημογραφικά, κλινικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά των 363 ασθενών με ΚΕΚ που συλλέχθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Η μέση τιμή της ηλικίας των ασθενών ήταν 42.67, η τυπική απόκλιση αυτής 21.8 και το εύρος των ηλικιών 18-88.

Η βαρύτητα της κάκωσης καταγράφηκε κατά την είσοδο των ασθενών στο νοσοκομείο με βάση την Κλίμακα Γλασκώβης (GCS). Σύμφωνα με τις 3 υποκατηγορίες της GCS, το 35,8% των ασθενών είχε βαριά κλινική εικόνα $GCS \leq 8$, το 14,9% αυτών είχε κλίμακα Γλασκώβης 9-12 και το 49,3% είχε καλή κλινική εικόνα κατά την είσοδο στο νοσοκομείο (GCS 13-15).

Επιπλέον έγινε κατηγοριοποίηση των ασθενών ανάλογα με τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας ως προς την ύπαρξη αιμορραγικού συμβάντος και το είδος της αιμορραγίας την οποία είχαν. Κάποιο, οπουδήποτε είδους αιμορραγία παρουσίασαν 278 ασθενείς δηλαδή το 73,8%. Πιο συγκεκριμένα 152 ασθενείς (ποσοστό 41,8%) παρουσίασαν αιμορραγική θλάση, 178 ασθενείς (ποσοστό 49,0%) είχαν υπαραχνοειδή αιμορραγία, ενώ 48 ασθενείς (ποσοστό 13,2%) είχαν επισκληρίδιο αιμάτωμα και 95 ασθενείς (ποσοστό 26,2%) εμφάνισαν υποσκληρίδιο αιμάτωμα. Τέλος 30 ασθενείς (ποσοστό 8,3%) παρουσίασαν ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα και 47 (ποσοστό 13,0%) ασθενείς ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.

Ακόμη χωρίσαμε τους ασθενείς σε 2 κατηγορίες, σε αυτούς με ευνοϊκή έκβαση και σε αυτούς με μη ευνοϊκή έκβαση με βάση τη κλίμακα έκβασης Γλασκώβης. Πιο συγκεκριμένα στην πρώτη κατηγορία (με ευνοϊκή έκβαση) περιλαμβάνονται τα στάδια 5 και 4 της GOS ενώ στη δεύτερη κατηγορία (με δυσμενή έκβαση) περιλαμβάνονται τα στάδια 3, 2 και 1 της GOS, και μελετήσαμε την ευνοϊκή και δυσμενή έκβαση των ασθενών με ΚΕΚ ως προς το φύλο, την ηλικία και την GCS κατά την εισαγωγή. Έτσι είχαμε τα εξής αποτελέσματα:

1. ως προς το φύλο

228 άνδρες (ποσοστό 80,3%) και 56 γυναίκες (ποσοστό 19,7%) είχαν ευνοϊκή έκβαση, ενώ 64 άνδρες (ποσοστό 81,0%) και 15 γυναίκες (19,0%) δυσμενή,

2. ως προς την ηλικία

Η μέση ηλικία ασθενών με ευνοϊκή έκβαση ήταν 39,20 ενώ αυτών με δυσμενή έκβαση 55,19,

3. ως προς την GCS κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο.

Από τους ασθενείς με GCS 3-8, 78 (ποσοστό 27,5%) είχαν ευνοϊκή έκβαση ενώ 52 (ποσοστό 65,8) δυσμενή. Από αυτούς με GCS 9-12, 36 ασθενείς (ποσοστό 12,7%) είχαν ευνοϊκή έκβαση και 18 (ποσοστό 22,8%) δυσμενή. Τέλος από τους ασθενείς με GCS 13-15, 170 ασθενείς

(ποσοστό 59,8%) είχαν ευνοϊκή έκβαση και 9 (11,4%) δυσμενή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων ως προς όλο το δείγμα της μελέτης με ΚΕΚ των ασθενών με ΚΕΚ, καθώς και οι συχνότητες αυτών σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν ευνοϊκή και δυσμενή έκβαση με βάση την μετά 6-μήνες GOS φαίνονται στον πίνακα 8. Με τη χρήση του προγράμματος Fisher exact test, βρέθηκε ότι πολυμορφισμός rs4343 δεν βρισκόταν σε Hardy-Weinberg ισορροπία και αποκλείστηκε από τις περαιτέρω αναλύσεις, ενώ αντίθετα οι λοιποί πολυμορφισμοί (rs4461142, rs7221780, rs8066276, rs8066114) βρισκόταν σε Hardy-Weinberg ισορροπία, 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.

Στη πολυπαραγοντική ανάλυση η **ηλικία** [OR: 1,09, 95% C.I. (01.06 έως 01.12), $p < 0,001$] και η **GCS εισόδου** [OR: 0,56, 95% C.I. (0,48 έως 0,65), $p < 0.001$], αλλά όχι το φύλο σχετίζονταν σημαντικά με την GOS μετά από 6 μήνες.

Επιπλέον, δύο SNPs βρέθηκαν να επηρεάζουν την έκβαση της ΚΕΚ: ο rs7221780 και ο rs8066276. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό **rs7221780**, βρέθηκε συσχέτιση με την έκβαση της ΚΕΚ σε όλα τα υποθετικά μοντέλα κληρονόμησης. Στο επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης [OR=3.66, CI95%=(1.65-8.13) και $p=0.0015$], στο υπολειπόμενο μοντέλο υπάρχει μία τάση για συσχέτιση οριακή [OR=4.46, CI95%=(1.44-13.87) και $p=0.00973$] και στο μοντέλο αντίθεσης αλληλίων [OR=3.19 CI95%=(1.71-5.96) και $p=0.0002$]. Για τον πολυμορφισμό **rs8066276**, φαίνεται συσχετίζεται με την έκβαση της ΚΕΚ τόσο στο επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης [OR=3.87, CI95%=(1.78-8.42) και $p=0.0007$] όσο και στο μοντέλο αντίθεσης αλληλίων [OR=3.28, CI95%=(1.75-6.15) και $p=0.0002$]. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση έγινε σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο και GCS-εισόδου (πίνακας 9).

Τέλος, επτά απλότυποι (TTCG, CCTC, CTCC, TCTC, TTCC, CCCC,CTCG οι οποίοι προήλθαν από τους πολυμορφισμούς rs4461142 C/T, rs7221780 T/C, rs8066276 C/T, rs8066114 C/G, ελέγχθηκαν για πιθανή συσχέτιση με ευνοϊκή ή δυσμενή έκβαση ασθενών με ΚΕΚ χωρίς όμως να προκύπτει τέτοια συσχέτιση. Στην ανάλυση έγινε σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο GCS-εισόδου και GOS-μετά 6 μήνες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 10. Η ανισορροπία σύνδεσης [υπολογισμός με SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>)] [195] για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς του γονιδίου ACE στους ασθενείς της μελέτης παρουσιάζεται στον πίνακα 11 και απεικονίζεται στη εικόνα 26.

Πίνακας 6. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος των ασθενών με ΚΕΚ

Χαρακτηριστικά (n=363)	mean (SD, range)
Ηλικία (έτη)	42.67 (21.8, 18-88)
	Συχνότητα
Γυναίκες (n=71)	19.5 %
GCS 13-15 (n=179)	49.3 %
GCS 9-12 (n=54)	14.9 %
GCS 3-8 (n=130)	35.8 %
Αιμορραγικό συμβάν	
Οποιοδήποτε (n=268)	73.8 %
Αιμορραγική θλάση (n=152)	41.8 %
Υπαραχνοειδής αιμορραγία (n=178)	49.0 %
Επισκληρίδιο αιμάτωμα (n=48)	13.2 %
Υποσκληρίδιο αιμάτωμα (n=95)	26.2 %
Ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα (n=30)	8.3 %
Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (n=47)	13.0 %

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά ασθενών, GCS εισόδου και GOS μετά από 6 μήνες

	Όλο το δείγμα με ΚΕΚ (n=363)	Ευνοϊκή έκβαση (n=284)	Δυσμενής έκβαση (n=79)
	n (%)	n (%)	n (%)
Φύλο			
Ανδρας	292 (80.4)	228 (80.3)	64 (81.0)
Γυναίκα	71 (19.6)	56 (19.7)	15 (19.0)
Ηλικία (έτη)			
Mean	42.67	39.20	55.19
SD	21.80	20.15	23.05
Range	18-88	18-84	18-88
GCS εισόδου			
3-8	130 (35.8)	78 (27.5)	52 (65.8)
9-12	54 (14.9)	36 (12.7)	18 (22.8)
13-15	179 (49.3)	170 (59.8)	9 (11.4)

Πίνακας 8. Συχνότητες αλληλομόρφων και γονοτύπων των πολυμορφισμών σε όλο το δείγμα των ασθενών με ΚΕΚ, σε αυτούς με ευνοϊκή και σε αυτούς με δυσμενή έκβαση.

SNP	Γονότυποι/ αλλήλια	Όλο το δείγμα με ΚΕΚ,		Ευνοϊκή έκβαση,		Δυσμενής έκβαση,	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
rs4343							
Γονότυποι	A/A	78	(21.6)	56	(19.9)	22	(27.8)
	A/G	141	(39.1)	126	(44.7)	15	(19.0)
	G/G	142	(39.3)	100	(35.5)	42	(53.2)
Αλλήλιο	A	297	(41.1)	238	(42.2)	59	(37.3)
	G	425	(58.9)	326	(57.8)	99	(62.7)
rs4461142							
Γονότυποι	C/C	62	(17.8)	40	(14.1)	22	(28.9)
	C/T	173	(49.7)	152	(55.9)	21	(27.6)
	T/T	113	(32.5)	80	(29.4)	33	(43.4)
Αλλήλιο	C	297	(42.7)	232	(42.6)	65	(42.8)
	T	399	(57.3)	312	(57.4)	87	(57.2)
rs7221780							
Γονότυποι	T/T	131	(36.3)	110	(39.0)	21	(26.6)
	T/C	183	(50.7)	144	(51.1)	39	(49.4)
	C/C	47	(13.0)	28	(9.9)	19	(24.1)
Αλλήλιο	T	445	(61.6)	364	(64.5)	81	(51.3)
	C	277	(38.4)	200	(35.5)	77	(48.7)
rs8066276							
Γονότυποι	C/C	156	(43.5)	132	(47.1)	24	(30.4)
	C/T	172	(47.9)	126	(45.0)	46	(58.2)
	T/T	31	(8.6)	22	(7.9)	9	(11.4)
Αλλήλιο	C	484	(67.4)	390	(69.6)	94	(59.5)
	T	234	(32.6)	170	(30.4)	64	(40.5)
rs8066114							
Γονότυποι	C/C	108	(30.3)	74	(26.6)	34	(43.0)
	C/G	186	(52.1)	156	(56.1)	30	(38.0)
	G/G	63	(17.6)	48	(17.3)	15	(19.0)
Αλλήλιο	C	402	(56.3)	304	(54.7)	98	(62.0)
	G	312	(43.7)	252	(45.3)	60	(38.0)

Πίνακας 9. Πολυπαραγοντική ανάλυση των tag SNPs του ACE ως προς την μετά από 6 μήνες GOS σε ασθενείς με ΚΕΚ. (Ευνοϊκή έναντι δυσμενούς έκβασης μετά από προσαρμογή ως προς την ηλικία, το φύλο και την GCS-εισόδου).

SNPs	Model	OR (95%CI)	p-value
rs4343	Dominant	0.34 (0.17-0.69)	0.0029
	Recessive	1.15 (0.50-2.65)	0.742
	Allele difference	0.66 (0.42-1.04)	0.073
rs4461142	Dominant	0.49 (0.24-0.99)	0.047
	Recessive	3.01 (1.16-7.82)	0.024
	Allele difference	0.94 (0.56-1.57)	0.806
rs7221780	Dominant	3.66 (1.65-8.13)	0.0015
	Recessive	4.46 (1.44-13.87)	0.00973
	Allele difference	3.19 (1.71-5.96)	0.0002
rs8066276	Dominant	3.87 (1.78-8.42)	0.0007
	Recessive	4.05 (1.17-14.02)	0.027
	Allele difference	3.28 (1.75-6.15)	0.0002
rs8066114	Dominant	0.43 (0.20-0.93)	0.031
	Recessive	0.61 (0.25-1.5)	0.281
	Allele difference	0.58 (0.94-0.38)	0.042

Πίνακας 10. Προβλεπόμενοι απλότυποι των tag SNPs του ACE στους ασθενείς με ευνοϊκή και με δυσμενή έκβαση (μετά από προσαρμογή ως προς την ηλικία, το φύλο και την GCS-εισόδου).

Απλότυπος	Ευνοϊκή έκβαση (%)	Δυσμενής έκβαση (%)	OR (95%CI)	p-value
1.TTCG	42.8%	34.6%	0.65 (0.31-1.35)	0.238
2.CCTC	23.8%	23.7%	1.71 (0.75-3.85)	0.206
3.CTCC	09.5%	05.6%	0.51 (0.19-1.29)	0.151
4.TCTC	06.8%	14.4%	3.16 (1.18-8.09)	0.0182
5.TTCC	07.5%	08.2%	0.99 (0.25-3.80)	0.807
6.CCCC	04.9%	08.6%	1.03 (0.35-2.99)	0.772
7.CTCG	04.2%	04.9%	0.48 (0.12-1.75)	0.247

Πίνακας 11. Ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium: LD) για tag SNPs του ACE στους ασθενείς με ΚΕΚ που συμμετείχαν στη μελέτη. Φαίνονται οι τιμές των D' και r^2 .

rs4343	0.666	0.339	0.467	0.868	
rs4461142	0.777	0.486	0.607		0.678
rs7221780	1.000	0.985		0.300	0.196
rs8062276	1.000		0.755	0.152	0.080
rs8066114		0.388	0.496	0.367	0.247
D'	rs8066114	rs8062276	rs7221780	rs4461142	rs4343
r^2					



Εικόνα 26. Απεικόνιση της κατανομής της ανισορροπίας σύνδεσης D' (αριστερά) και r^2 (δεξιά) στο δείγμα μας για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς του γονιδίου ACE. Δημιουργία εικόνας με το πρόγραμμα SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>) [195].

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη μας διερευνήσαμε την έκβαση των ασθενών με ΚΕΚ (ευνοϊκή ή δυσμενή με βάση την μετά από 6 μήνες GOS) σε σχέση με την GCS κατά την εισαγωγή, το φύλο και την ηλικία. Επίσης μελετήσαμε την επίδραση tag SNPs του ACE (rs4343, rs4461142, rs7221780, rs8066276, rs8066114) στη έκβασή ασθενών με ΚΕΚ (με βάση την GOS μετά από 6 μήνες) καθώς και συσχέτιση αυτής με τους εξής απλότυπους: TTCCG, CCTC, CTCC, TCTC, TTCC, CCCC, CTCG. Στη πολυπαραγοντική ανάλυση η **ηλικία** [OR: 1,09, 95% C.I. (01.06 έως 01.12), $p < 0,001$] και η **GCS εισόδου** [OR: 0,56, 95% C.I. (0,48 έως 0,65), $p < 0.001$], αλλά όχι το φύλο σχετιζόνταν σημαντικά με την GOS μετά από 6 μήνες. Επιπλέον, δύο SNPs βρέθηκαν να επηρεάζουν την έκβαση της ΚΕΚ: ο rs7221780 και ο rs8066276. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό **rs7221780** βρέθηκε συσχέτιση με την έκβαση της ΚΕΚ σε όλα τα υποθετικά μοντέλα κληρονόμησης. Στο επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης [OR=3.66, CI95%=(1.65-8.13) και $p=0.0015$] στο υπολειπόμενο μοντέλο υπάρχει μία τάση για συσχέτιση οριακή [OR=4.46, CI95%=(1.44-13.87) και $p=0.00973$] και στο μοντέλο αντίθεσης αλληλίων [OR=3.19 CI95%=(1.71-5.96) και $p=0.0002$], ο rs7221780 φαίνεται να σχετίζεται με την έκβαση της ΚΕΚ. Για τον πολυμορφισμό **rs8066276**, φαίνεται να συσχετίζεται με την έκβαση της ΚΕΚ τόσο στο επικρατητικό μοντέλο κληρονόμησης [OR=3.87, CI95%=(1.78-8.42) και $p=0.0007$] όσο και στο μοντέλο αντίθεσης αλληλίων [OR=3.28, CI95%=(1.75-6.15) και $p=0.0002$]. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση έγινε σταθεροποίηση για ηλικία, φύλο και GCS-εισόδου. Τέλος, από τους επτά απλότυποι (TTCCG, CCTC, CTCC, TCTC, TTCC, CCCC,CTCG οι οποίοι προήλθαν από τους πολυμορφισμούς rs4461142 C/T, rs7221780 T/C, rs8066276 C/T, rs8066114 C/G, δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση. Πέρα από την συσχέτιση των 2 SNPs (rs7221780 rs8066276) με την έκβαση της ΚΕΚ, πολύ ενδιαφέρον είναι ότι στο δείγμα μας παρατηρήθηκε υψηλή ανισορροπία γενετικής σύνδεσης μεταξύ αυτών των δύο SNPs με $D' = 0.985$ που αποτελεί την τρίτη μεγαλύτερη τιμή στο δείγμα μας και $r^2 = 0.755$ η οποία είναι και η μεγαλύτερη τιμή. Δηλαδή φαίνεται πως οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί, οι οποίοι βρέθηκε να επηρεάζουν την έκβαση της ΚΕΚ, εμφανίζουν και μία τάση, αρκετά υψηλή, να κληρονομούνται μαζί.

Η σημαντική ποικιλομορφία και ανομοιογένεια της έκβασης μετά από μία κρανιοεγκεφαλική κάκωση δεν μπορεί να εξηγηθεί πλήρως με τους μέχρι τώρα γνωστούς παράγοντες κινδύνου. Το ενδιαφέρον στρέφεται γύρω από τη συμβολή γενετικών μηχανισμών και την συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία της ΚΕΚ. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί επηρεάζουν σε κάποιο βαθμό την έκταση της βλάβης του εγκεφάλου μετά από ΚΕΚ [70, 204]. Μετά την ΚΕΚ πληθώρα πολύπλοκων δευτεροπαθών αλλοιώσεων επάγονται αμέσως και περιλαμβάνουν τη διάσπαση του αιμοτοεγκεφαλικού φραγμού, τη δημιουργία οιδήματος, την μειωμένη αιμάτωση από την αλλοίωση της τοπικής αιματικής ροής, την αλλαγή της βατότητας

της μεμβράνης των νευρικών κυττάρων και της νευρογλοίας που συνοδεύεται από έξοδο καλίου στον εξωκυττάριο χώρο και άλλων κυτταροτοξικών ουσιών, με συνέπεια τη διαταραχή στη μεταβίβαση των νευρικών ερεθισμάτων. Ακόμη τα ιόντα Ca^{2+} που εισρέουν στον ενδοκυττάριο χώρο και προκαλούν βλάβη στη λειτουργία των μιτοχονδρίων και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που με την υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών των κυττάρων περίξ της κακώσεως και τέλος έχουμε την παραγωγή διάφορων επιβλαβών πρωτεϊνών [221], με συνέπεια τη διαταραχή στη μεταβίβαση των νευρικών ερεθισμάτων. Επιπλέον γίνεται φανερός ο κεντρικός ρόλος της φλεγμονώδους αντίδρασης στην παθογένεση της εγκεφαλικής βλάβης μετά από τραύμα [222]. Επίσης πρέπει να σημειώσουμε πως οι δευτεροπαθείς βλάβες οι οποίες συμβαίνουν (κυρίως ισχαιμικές) μπορούν να έχουν ως αίτια δυσλειτουργίας από διάφορα συστήματα (υποξαιμία, αρτηριακή υπόταση, αύξηση του CO_2 , υποθερμία, υπονατρία, αναιμία και διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη) και από τον εγκέφαλο (αιματώματα, οίδημα εγκεφάλου, ενδοκρανιακή υπέρταση, σπασμό αγγείων, ενδοκρανιακή μόλυνση και επιληψία).

Η εκτεταμένη έρευνα για τον εντοπισμό της περιοχής του γονιδίου του ACE που ρυθμίζει τη δραστηριότητα του ACE του πλάσματος δικαιολογείται πλήρως, καθώς η ταυτοποίηση του θα έχουν ενδεχομένως αντίκτυπο στον τομέα της φαρμακογονιδιωματικής και εξατομικευμένη προσέγγιση, καθώς οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE inhibitors) και οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II (ARBs) έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στην κλινική πρακτική. Σε μία μελέτη αρουραίων που έπασχαν από εγκεφαλικό επεισόδιο, η ιμιδαπρίλη, ένας αναστολέα του MEA, μείωσε το σχηματισμό οιδήματος στο φλοιό, στον υπόκαμπο και στο ραβδωτό σώμα [226]. Σε μία άλλη μελέτη η προφυλακτική χορήγηση καντεσαρτάνης, ενός AT1 ανταγωνιστή, φάνηκε να προστατεύει από εμφάνιση εγκεφαλικής ισχαιμίας σε υπερτασικούς αρουραίους [227].

Οι βλάβες του μετωπιαίου λοβού σε εκτεταμένη ΚΕΚ έχουν συσχετιστεί με βλάβη της λευκής ουσίας [228] και αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα παθολογίας των αγγείων. Διαταραχές των αγγείων του εγκεφάλου ακολουθούν συνήθως τις ΚΕΚ [229, 230]. Η τοπική μείωση της CBF λόγω αγγειοσπασμού, προκαλεί ισχαιμία, που είναι μια από τις πιο συχνές αιτίες εγκεφαλική υποξίας του εγκεφαλικού ιστού σε ΚΕΚ. Έχει προταθεί ότι εγκεφαλική ισχαιμία μπορεί να προκαλέσει μια αλλαγή στην έκφραση των τοπικών αγγειακών υποδοχέων και στη λειτουργία αυτών. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι έχει παρατηρηθεί τοπικά αυξημένη παραγωγή της αγγειοτενσίνης II μετά από εγκεφαλική ισχαιμία [231]. Σε αντίθεση με αυτό, στοιχεία από άλλες πειραματικές μελέτες δείχνουν πως ο αγγειόσπασμος των εγκεφαλικών αγγείων μετά από αιμορραγία μπορεί να οφείλεται στην αγγειοσυσταλτική δράση της τοπικά παραγόμενης αγγειοτενσίνης II [232]. Πειραματικά στοιχεία υποδηλώνουν μια πιθανή επίδραση των αναστολέων του MEA, προστατεύοντας τον εγκέφαλο από εγκεφαλική ισχαιμία κατά τη

διάρκεια απότομων μειώσεων της αρτηριακής πίεσης [233] και ότι ο εκλεκτικός αποκλεισμός των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II μπορεί αποτελέσουν ένα σημαντικό δρόμο για την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών με στόχο την πρόληψη και ανακούφιση από τις δευτερογενείς εγκεφαλικές βλάβες μετά από μία σοβαρή ΚΕΚ [234]. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως γενετικοί πολυμορφισμοί του ACE, ασκούν κάποιο προστατευτικό ρόλο (μέσω κυρίως της δράσης της αγγειοτενσίνης-II), και να αποτρέπουν από επεισόδια εγκεφαλικής ισχαιμίας τα οποία σχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα και αποτελούν σημαντικό στοιχείο της δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΚΕΚ. Η διαταραχή της ροής του αίματος στον εγκέφαλο και/ή η αυτορρύθμιση της πίεσης του αίματος πιθανό να επηρεάζουν την σύσπαση των εγκεφαλικών αγγείων και την εγκεφαλική βλάβη μετά από ισχαιμία. Η δευτεροπαθής εγκεφαλική βλάβη μετά από ΚΕΚ, επιτείνεται λόγω της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και του οξειδωτικού stress [198, 199, 211]. Όταν συμβαίνει θλάση στον εγκεφαλικό ιστό συμβαίνουν τα εξής: μείωση της αιματικής ροής, βλάβη των αγγείων και κατ' επέκταση τοπική ισχαιμία, απώλεια της ικανότητας των αγγείων του εγκεφάλου για αυτορρύθμιση, καθώς και συστηματική υπόταση. Αφού λοιπόν συμβεί αυτή η ισχαιμία λόγω θλάσης, ακολουθεί η επαναϊμάτωση. Η επαναϊμάτωση στη συνέχεια έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και των ενδιάμεσων του ενεργού οξυγόνου (reactive oxygen intermediates) [200]. Τελική συνέπεια όλων αυτών είναι ο θάνατος των νευρικών κυττάρων.

Έχει βρεθεί ότι το ACE εμπλέκεται στη ρύθμιση των νευροκινών (neurokinins) οι οποίες νευροκίνες συμβάλουν στη μετατροπή των φλεγμονωδών και ανοσοποιητικών αποκρίσεων [174, 175]. Οι μεταβολές στην αιματική ροή οι οποίες μπορεί να επέρχονται μέσω της μεταβολής της διαμέτρου των αγγείων, θα μπορούσαν να μεταβάλλουν την φλεγμονώδη αντίδραση με αποτέλεσμα την τροποποίηση της διήθησης των ανοσοποιητικών κυττάρων, της δημιουργία του οιδήματος καθώς και της ενεργοποίησης των διαφόρων φλεγμονωδών εγκεφαλικών κυττάρων, αφού η αγγειοδιαστολή και η αύξηση της αιματικής ροής είναι το επακόλουθο της ιστικής καταστροφής [203]. Επιπλέον αλλαγή στη επακόλουθη παραγωγή των ποικίλων φλεγμονωδών μορίων (όπως είναι το συμπλήρωμα, οι πρωτεΐνες της οξείας φάσης, τα μόρια προσκόλλησης και οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες) μεταβάλλοντας έτσι τη βλάβη του εγκεφαλικού ιστού.

Η τοπική RAS στον εγκέφαλο θεωρείται ότι παίζει ένα λειτουργικό ρόλο στην διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Τα επίπεδα του αγγειοτενσινογόνου, αλλά όχι τα επίπεδα της ρενίνης στον εγκέφαλο φαίνεται να είναι σημαντικά για τη λειτουργία αυτή, δεδομένου ότι διαταραχή του BBB παρατηρείται σε ποντίκια με ανεπάρκεια αγγειοτενσινογόνου, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται σε ποντίκια με ανεπάρκεια ρενίνης [235]. Άλλες μελέτες σε knock-out ποντίκια κατέληξαν σε παρόμοια συμπεράσματα. Αστροκύτταρα ποντικών με knockout αγγειοτενσινογόνο παρουσίασαν ελλιπή ανασύσταση του διαταραγμένου

BBB [236]. Οι Monti et al. [237] βρήκαν λειτουργική αύξηση των υποδοχέων AT1 εσωτερικό του BBB σε διαγονιδιακό αρουραίο με μείωση της σύνθεσης του αγγειοτενσινογόνου από τα αστρογλοιακά κύτταρα. Όπως αναφέραμε και πιο πάνω, μία ΚΕΚ μπορεί να οδηγήσει σε οίδημα του εγκεφάλου το οποίο μπορεί να είναι αγγειοκινητικό (vasogenic edema) ή κυτταροτοξικό (cytotoxic edema) και πως στο αγγειοκινητικό οίδημα έχουμε διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, με συνέπεια τη διαρροή υγρού στον εξωκυττάριο χώρο, ενώ στο κυτταροτοξικό οίδημα παρατηρείται οίδημα των νευρώνων ή της γλοίας. Ίσως μέσω του RAS συστήματος, να υπάρχει μικρότερη διαταραχή του BBB με συνέπεια παρεμπόδιση ανάπτυξης και του αγγειοκινητικού οιδήματος και του κυτταροτοξικού οιδήματος γιατί σε μία ΚΕΚ, και οι δύο τύποι του οιδήματος είναι παρόντες στον ιστό του εγκεφάλου και αναπτύσσονται με ένα διαφασικό πρότυπο: το αγγειογενές οίδημα εμφανίζεται στις πρώτες μετατραυματικές ώρες, ως αποτέλεσμα της ρήξης του BBB, η οποία αποκαθίσταται σταδιακά μέσα στις 7 τελευταίες ημέρες, ενώ το κυτταροτοξικό οίδημα αναπτύσσεται πιο αργά, αλλά επιμένει για μέχρι και 2 εβδομάδες [216, 217]. Επιπλέον, η αγγειοτενσίνη-II συμβάλλει στη ρύθμιση της λειτουργίας του αίματο-εγκεφαλικού φραγμού, μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων AT1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα των εγκεφαλικών αγγείων και η δέσμευση των AT1 υποδοχέων της αγγειοτενσίνης-II αποτρέπει επαγόμενη παθολογική αύξηση της διαπερατότητας του αίματο-εγκεφαλικού φραγμού [223]. Σε μοντέλα τρωκτικών, η αναστολή του ACE, με τη μείωση του σχηματισμού αγγειοτενσίνης-II, μειώνει την ευαισθησία του εγκεφάλου σε ισχαιμία, μειώνοντας το μέγεθος της βλάβης του αίματο-εγκεφαλικού φραγμού και μειώνοντας έτσι την έκταση του οιδήματος του εγκεφάλου, και βελτιώνοντας τη νευρολογική έκβαση μετά την ισχαιμία και μειώνοντας τη θνησιμότητα [224, 225].

Επίσης, σε μία μελέτη της Νευρολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μελετήθηκαν τα ίδια SNPs του ACE γονιδίου δηλαδή οι rs4343, rs4461142, rs7221780, rs8066276, rs8066114, που μελετήθηκαν και στην παρούσα μελέτη, σε 250 Έλληνες και 169 Πολωνούς ασθενείς με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (ICH: intracerebral hemorrhage) και 250 Έλληνες και 322 Πολωνούς ως control. Στην πολωνική ομάδα, παρατηρήθηκε μια τάση προς για συσχέτιση μεταξύ του rs4461142 και την ηλικία έναρξης της ICH και ακόμη για έναν απλότυπο, τον GTCTC παρατηρήθηκε μια τάση για αυξημένο κίνδυνο για ICH, χωρίς ωστόσο αυτά τα αποτελέσματα, να παρατηρούνται στην ελληνική ομάδα. Συμπερασματικά, δεν υπήρξαν σαφείς ενδείξεις για το ρόλο του γονιδίου ACE στην ανάπτυξη της ICH [209].

Ανακεφαλαιώνοντας μπορούμε να πούμε πως η παρεμπόδιση ανάπτυξης του εγκεφαλικού οιδήματος και της εγκεφαλικής ισχαιμίας, την ελάττωση των δευτερογενών βλαβών από το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και την τροποποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης, ίσως να μεταβάλλεται η πορεία της παθοφυσιολογίας της ΚΕΚ, και

ίσως να προλαμβάνεται ο κυτταρικός θάνατος, η καταστροφή των νευροαξόνων, η απομυελίνωση και εγκεφαλική ατροφία.

Η μελέτη μας ικανοποιούσε όλους τους περιορισμούς που ισχύουν για τη μελέτες γενετικής συσχέτισης [238]. Δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο μεροληψίας στην επιλογή των ασθενών, μιας και η μελέτη μας βασίζεται στις εισαγωγές ασθενών στα επείγοντα του νοσοκομείου και έτσι οι ηπιότερες περιπτώσεις μπορεί να μην περιλαμβάνονται. Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε ένα μέτρο εκτίμησης σωματικής αναπηρίας, την κλίμακα GOS. Η χρήση των πρόσθετων κλιμάκων για την εκτίμηση αυτή, όπως το Injury Severity Score ή το Disability Rating Scale, πιθανότατα να αύξανε την αξιοπιστία των ευρημάτων μας. Επιπλέον, προκειμένου να αυξήσουμε την ισχύ της μελέτης μας, χωρίσαμε σε 2 κατηγορίες την GOS. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η προσέγγιση αυτή μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να τροποποιήσει την ευαισθησία του αποτελέσματος [239].

Εμείς μελετήσαμε την έκβαση ασθενών με ΚΕΚ, με βάση διάφορους επιβαρυντικούς παράγοντες. Όπως είδαμε μελετήσαμε την ύπαρξη συσχέτισης της έκβασης ΚΕΚ ως προς το φύλο, την ηλικία και την GCS εισόδου. Η χρήση πρόσθετων κλινικών μεταβλητών, και επιπλέον μελέτες σε σχέση με άλλους επιβαρυντικούς παράγοντες της ΚΕΚ, όπως κλινικά οι αντιδράσεις της κορών των οφθαλμών, θα μπορούσαν να αυξήσουν την πιθανότητα να αποκαλυφθούν τα καθαρά αποτελέσματα επίδρασης των SNPs στις ΚΕΚ. Η συσχέτιση της έκβασης της ΚΕΚ ως προς προϋπάρχουσες βλάβες και νόσους του εγκεφάλου και ως προς την ύπαρξη σημείων που υποδηλώνουν βλάβες στο στέλεχος του εγκεφάλου (τα αντανακλαστικά των κορών όπως προείπαμε ή/και το αιθουσο-οφθαλμικό αντανακλαστικό) θα ήταν ευπρόσδεκτες. Επιπλέον μελέτη που θα συμπεριλαμβάνουν επιβαρυντικούς παράγοντες όπως διαταραχές από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ), την φύση της εγκεφαλικής κάκωσης καθώς και την αυξημένη ενδοκράνια πίεση, θα διαφωτίσουν περισσότερο τη γενετική της έκβασης των ασθενών με ΚΕΚ.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη παρέχει ενδείξεις για την πιθανή εμπλοκή των γενετικών παραλλαγών στο γονίδιο ACE στην κλινική έκβαση των ασθενών με ΚΕΚ. Επιπλέον μελέτες σε πιο μεγάλα δείγματα ασθενών και μάλιστα διαφορετικών εθνοκοιτητων, καθώς και σε άλλα γονίδια και πολυμορφισμούς θα πρέπει να πραγματοποιηθούν, ώστε να έχουμε μία πιο σαφή και ξεκάθαρη εικόνα για την γενετική των ΚΕΚ. Ίσως θα έπρεπε να πραγματοποιηθούν μελέτες, στοχεύοντας σε πολυμορφισμούς γονιδίων που κωδικοποιούν άλλα μόρια-προϊόντα τα οποία συμμετέχουν στο σύστημα RAS ή/και των υποδοχέων μέσω τον οποίον πραγματοποιούνται οι λειτουργίες των μορίων αυτών. Χρήσιμη θα ήταν περαιτέρω έρευνα με στόχο ιστοειδικών μορίων που συμμετέχουν στο RAS του νευρικού συστήματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Selassie AW, Zaloshnja E, Langlois JA, Miller T, Jones P, Steiner C. Incidence of long-term disability following traumatic brain injury hospitalization, United States, 2003. J Head Trauma Rehabil. 2008;23(2):123–131.**
- 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. Dennis L. Kasper, Eugene Braunwald, Anthony Fauci, Stephen Hauser, Dan Longo, J. Larry Jameson, Harrison Εσωτερική Παθολογία, 16η Έκδοση, 3ος Τόμος, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2005:2647-2651.**
- 5. Φόρογλου, Γεώργιος, Π., Νευροχειρουργική, Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Επίκεντρο Α.Ε., 1999:59-60, 68-76, 103-104, 308-310.**
- 6. 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.**
- 7. Τσικόπουλος, Φίλιππος, Δ., Νευροχειρουργική κριτική και πρακτική προσέγγιση, Αθήνα, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2005:3-4,14-15,47.**
- 8. 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.**
- 9. Bayir H, Clark RS, Kochanek PM. Promising strategies to minimize secondary brain injury after head trauma. Crit Care Med 2003; 31:S112-7.**
- 10. 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.**
- 11. Golding EM. Sequelae following traumatic brain injury. The cerebrovascular perspective. Brain Res Brain Res Rev 2002; 38:377-88.**
- 12. 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.**

13. 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.
14. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev* 2002; 39:55-73.
15. Raghupathi R, McIntosh TK, Smith DH. Cellular responses to experimental brain injury. *Brain Pathol* 1995; 5:437-42.
16. 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.
17. McIntosh TK. Neurochemical sequelae of traumatic brain injury: therapeutic implications. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994; 6:109-62.
18. 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.
19. Ye Xiong, Asim Mahmood & Michael Chopp. Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience* 2013; 14(2):128-142.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Signoretti S, Marmarou A, Tavazzi B, Lazzarino G, Beaumont A, Vagnozzi R. NAcetylaspartate reduction as a measure of injury severity and mitochondrial dysfunction following diffuse traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2001; 18:977-91.

26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Kontos HA, George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 1985; 57:508-16.
37. Kontos HA. Oxygen radicals in CNS damage. *Chem Biol Interact* 1989; 72:229-55.

38. Kontos HA, Povlishock JT. Oxygen radicals in brain injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 1986; 3:257-63.
39. 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.
40. Kampfl A, Posmantur R, Nixon R, Grynspan F, Zhao X, Liu SJ, Newcomb JK, Clifton GL, Hayes RL. μ -calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *J Neurochem* 1996; 67:1575-83.
41. Saatman KE, Graham DI, McIntosh TK. The neuronal cytoskeleton is at risk after mild and moderate brain injury. *J Neurotrauma* 1998; 15:1047-58.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000; 17:927-38.

50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
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. Conley YP, Alexander S. Genomic, transcriptomic, and epigenomic approaches to recovery after acquired brain injury. *Pm R* 2011;3:S52-58.
63. Du L, Pollard JM, Gatti RA. Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6007-6012.
64. Wood MJ, Gait MJ, Yin H. RNA-targeted splice-correction therapy for neuromuscular disease. *Brain* 2010;133:957-972.
65. Lipsky RH, Sparling MB, Ryan LM, et al. Association of COMT Val158Met genotype with executive functioning following traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2005;17:465-471
66. 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;61:683-685.
67. Ganten D, Marquez-Julio A, Granger O, Hayduk K, Karsunky KP, Boucher R, Genest J. Renin in dog brain. *Am J Physiol.* 1971; 221: 1733–1737.
68. Ganten D, Minnich JL, Granger P, Hayduk K, Brecht HM, Barbeau A, Boucher R, Genest J. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science.* 1971; 173: 64–65
69. Dardiotis E, Fountas KN, Dardioti M, et al. Genetic association studies in patients with traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 2010;28:E9.
70. Dardiotis E, Grigoriadis S, Hadjigeorgiou GM. Genetic factors influencing outcome from neurotrauma. *Curr Opin Psychiatry* 2012;25:231-238.
71. Liaquat I, Dunn LT, Nicoll JA, Teasdale GM, Norrie JD. Effect of apolipoprotein E genotype on hematoma volume after trauma. *J Neurosurg* 2002;96:90-96.
72. Chiang MF, Chang JG, Hu CJ. Association between apolipoprotein E genotype and outcome of traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)* 2003;145:649-653; discussion 653-644.
73. 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;98:302-306.
74. Diaz-Arrastia R, Gong Y, Fair S, et al. Increased risk of late posttraumatic seizures associated with inheritance of APOE epsilon4 allele. *Arch Neurol* 2003;60:818-822.
75. Millar K, Nicoll JA, Thornhill S, Murray GD, Teasdale GM. Long term neuropsychological outcome after head injury: relation to APOE genotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1047-1052.

76. Chamelian L, Reis M, Feinstein A. Six-month recovery from mild to moderate Traumatic Brain Injury: the role of APOE-epsilon4 allele. *Brain* 2004;127:2621-2628.
77. Teasdale GM, Murray GD, Nicoll JA. The association between APOE epsilon4, age and outcome after head injury: a prospective cohort study. *Brain* 2005;128:2556-2561.
78. Alexander S, Kerr ME, Kim Y, Kamboh MI, Beers SR, Conley YP. Apolipoprotein E4 allele presence and functional outcome after severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24:790-797.
79. 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;79:426-430.
80. Brichtova E, Kozak L. Apolipoprotein E genotype and traumatic brain injury in children--association with neurological outcome. *Childs Nerv Syst* 2008;24:349-356.
81. Lo TY, Jones PA, Chambers IR, et al. Modulating effect of apolipoprotein E polymorphisms on secondary brain insult and outcome after childhood brain trauma. *Childs Nerv Syst* 2009;25:47-54.
82. Moran LM, Taylor HG, Ganesalingam K, et al. Apolipoprotein E4 as a predictor of outcomes in pediatric mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2009;26:1489-1495.
83. Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet* 1997;350:1069-1071.
84. Ponsford J, McLaren A, Schonberger M, et al. The association between apolipoprotein E and traumatic brain injury severity and functional outcome in a rehabilitation sample. *J Neurotrauma* 2011;28:1683-1692.
85. Brichtova E, Mackerle Z. Apolipoprotein E Genotype as an Independent Prognostic Factor for Clinical Outcome in Traumatic Brain Injury in Children and the Adolescent Population. *CESKA A SLOVENSKA NEUROLOGIE A NEUROCHIRURGIE* 2011;74:437-442.
86. 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;25:279-290.
87. 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;1:135-137.
88. Johnson VE, Murray L, Raghupathi R, et al. No evidence for the presence of apolipoprotein epsilon4, interleukin-1alpha allele 2 and interleukin-1beta allele 2 cause an increase in programmed cell death following traumatic brain injury in humans. *Clin Neuropathol* 2006;25:255-264.

89. Isoniemi H, Kurki T, Tenovuo O, Kairisto V, Portin R. Hippocampal volume, brain atrophy, and APOE genotype after traumatic brain injury. *Neurology* 2006;67:756-760.
90. Kerr ME, Kamboh MI, Kong Y, Alexander S, Yonas H. Apolipoprotein E genotype and CBF in traumatic brain injured patients. *Adv Exp Med Biol* 2006;578:291-296.
91. 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;21:1307-1314.
92. Smith C, Graham DI, Murray LS, Stewart J, Nicoll JA. Association of APOE e4 and cerebrovascular pathology in traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:363-366.
93. Kristman VL, Tator CH, Kreiger N, et al. Does the apolipoprotein epsilon 4 allele predispose varsity athletes to concussion? A prospective cohort study. *Clin J Sport Med* 2008;18:322-328.
94. Terrell TR, Bostick RM, Abramson R, et al. APOE, APOE promoter, and Tau genotypes and risk for concussion in college athletes. *Clin J Sport Med* 2008;18:10-17.
95. Quinn TJ, Smith C, Murray L, Stewart J, Nicoll JA, Graham DI. There is no evidence of an association in children and teenagers between the apolipoprotein E epsilon4 allele and post-traumatic brain swelling. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004;30:569-575.
96. 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;76:229-233.
97. Kerr ME, Ilyas Kamboh M, Yookyung K, et al. Relationship between apoE4 allele and excitatory amino acid levels after traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2003;31:2371-2379.
98. Jiang L, Yin X, Yin C, Zhou S, Dan W, Sun X. Different quantitative EEG alterations induced by TBI among patients with different APOE genotypes. *Neurosci Lett* 2011;505:160-164.
99. Friedman G, Fromm P, Sazbon L, et al. Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury. *Neurology* 1999;52:244-248.
100. 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;278:136-140.
101. 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;408:155-158.

102. Hiekkänen 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.
103. Ost M, Nysten 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;52:1364-1369.
104. Lichtman SW, Seliger G, Tycko B, Marder K. Apolipoprotein E and functional recovery from brain injury following postacute rehabilitation. *Neurology* 2000;55:1536-1539.
105. Blackman JA, Worley G, Strittmatter WJ. Apolipoprotein E and brain injury: implications for children. *Dev Med Child Neurol* 2005;47:64-70.
106. Kutner KC, Erlanger DM, Tsai J, Jordan B, Relkin NR. Lower cognitive performance of older football players possessing apolipoprotein E epsilon4. *Neurosurgery* 2000;47:651-657; discussion 657-658.
107. Crawford FC, Vanderploeg RD, Freeman MJ, et al. APOE genotype influences acquisition and recall following traumatic brain injury. *Neurology* 2002;58:1115-1118.
108. Liberman JN, Stewart WF, Wesnes K, Troncoso J. Apolipoprotein E epsilon 4 and short-term recovery from predominantly mild brain injury. *Neurology* 2002;58:1038-1044.
109. Sundstrom A, Marklund P, Nilsson LG, et al. APOE influences on neuropsychological function after mild head injury: within-person comparisons. *Neurology* 2004;62:1963-1966.
110. Ariza M, Pueyo R, Matarin Mdel M, et al. Influence of APOE polymorphism on cognitive and behavioural outcome in moderate and severe traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:1191-1193.
111. Ponsford J, Rudzki D, Bailey K, Ng KT. Impact of apolipoprotein gene on cognitive impairment and recovery after traumatic brain injury. *Neurology* 2007;68:619-620.
112. Han SD, Drake AI, Cessante LM, et al. Apolipoprotein E and traumatic brain injury in a military population: evidence of a neuropsychological compensatory mechanism? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:1103-1108.
113. Rapoport M, Wolf U, Herrmann N, et al. Traumatic brain injury, Apolipoprotein E-epsilon4, and cognition in older adults: a two-year longitudinal study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2008;20:68-73.
114. Muller K, Ingebrigtsen T, Wilsgaard T, et al. Prediction of time trends in recovery of cognitive function after mild head injury. *Neurosurgery* 2009;64:698-704; discussion 704.

115. Ashman TA, Cantor JB, Gordon WA, et al. A comparison of cognitive functioning in older adults with and without traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 2008;23:139-148.
116. Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol* 1992;263:C1-16.
117. Shadli RM, Pieter MS, Yaacob MJ, Rashid FA. APOE genotype and neuropsychological outcome in mild-to-moderate traumatic brain injury: a pilot study. *Brain Inj* 2011;25:596-603.
118. Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, et al. ApoE as a prognostic factor for post-traumatic coma. *Nat Med* 1995;1:852.
119. 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.
120. Mayeux R, Ottman R, Maestre G, et al. Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1995;45:555-557.
121. Katzman R, Galasko DR, Saitoh T, et al. Apolipoprotein-epsilon4 and head trauma: Synergistic or additive risks? *Neurology* 1996;46:889-891.
122. Mehta KM, Ott A, Kalmijn S, et al. Head trauma and risk of dementia and Alzheimer's disease: The Rotterdam Study. *Neurology* 1999;53:1959-1962.
123. Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, et al. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* 2000;55:1158-1166.
124. Guo Z, Cupples LA, Kurz A, et al. Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. *Neurology* 2000;54:1316-1323.
125. Koponen S, Taiminen T, Kairisto V, et al. APOE-epsilon4 predicts dementia but not other psychiatric disorders after traumatic brain injury. *Neurology* 2004;63:749-750.
126. 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;118:153-158.
127. Tanriverdi F, Taheri S, Ulutabanca H, et al. Apolipoprotein E3/E3 genotype decreases the risk of pituitary dysfunction after traumatic brain injury due to various causes: preliminary data. *J Neurotrauma* 2008;25:1071-1077.

128. Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation* 2000;102:829-832.
129. Roskopf D, Michel MC. Pharmacogenomics of G protein-coupled receptor ligands in cardiovascular medicine. *Pharmacol Rev.* 2008 Dec;60(4):513-35.
130. Blummefeld H. Neuroanatomy through clinical cases. Sinauer Ass. Inc. Massachusetts, 2002
131. Rengachary S, Wilkins RH. Principles of Neurosurgery. Mosby, London, 1994
132. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, Van Duijn CM, Witteman JC. ACE polymorphisms. *Circ Res* 2006; 98:1123–1133.
133. Johnson VE, Stewart W, Stewart JE, Graham DI, Praestgaard AH, Smith DH. A Nprilysin Polymorphism and Amyloid-beta Plaques Following Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 2009.
134. Fisher DE. The p53 tumor suppressor: critical regulator of life & death in cancer. *Apoptosis* 2001;6:7-15.
135. Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000;17:927-938.
136. Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4961.
137. Martinez-Lucas P, Moreno-Cuesta J, Garcia-Olmo DC, et al. Relationship between the Arg72Pro polymorphism of p53 and outcome for patients with traumatic brain injury. *Intensive Care Med* 2005;31:1168-1173.
138. Tanriverdi T, Uzan M, Sanus GZ, et al. Lack of association between the IL1A gene (-889) polymorphism and outcome after head injury. *Surg Neurol* 2006;65:7-10; discussion 10.
139. 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;66:334-335.
140. Uzan M, Tanriverdi T, Baykara O, et al. Association between interleukin-1 beta (IL-1beta) gene polymorphism and outcome after head injury: an early report. *Acta Neurochir (Wien)* 2005;147:715-720.
141. Hadjigeorgiou GM, Paterakis K, Dardiotis E, et al. IL-1RN and IL-1B gene polymorphisms and cerebral hemorrhagic events after traumatic brain injury. *Neurology* 2005;65:1077-1082.

142. Allan SM. The role of pro- and antiinflammatory cytokines in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:84-93.
143. Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Hans V, et al. Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Mol Psychiatry* 1997;2:133-136.
144. 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;8:101-105.
145. 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;32:271-285.
146. Chiaretti A, Antonelli A, Mastrangelo A, et al. Interleukin-6 and nerve growth factor upregulation correlates with improved outcome in children with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2008;25:225-234.
147. Minambres E, Cemborain A, Sanchez-Velasco P, et al. Correlation between transcranial interleukin-6 gradient and outcome in patients with acute brain injury. *Crit Care Med* 2003;31:933-938.
148. Dalla Libera AL, Regner A, de Paoli J, Centenaro L, Martins TT, Simon D. IL-6 polymorphism associated with fatal outcome in patients with severe traumatic brain injury. *Brain Inj* 2011;25:365-369.
149. McAllister TW, Flashman LA, Harker Rhodes C, et al. Single nucleotide polymorphisms in ANKK1 and the dopamine D2 receptor gene affect cognitive outcome shortly after traumatic brain injury: a replication and extension study. *Brain Inj* 2008;22:705-714.
150. Wagner AK, Ren D, Conley YP, et al. Sex and genetic associations with cerebrospinal fluid dopamine and metabolite production after severe traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2007;106:538-547.
151. Suehiro T, Morita T, Inoue M, Kumon Y, Ikeda Y, Hashimoto K. Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA originating from the ACE allele with deletion. *Hum Genet* 2004; 115:91-96.
152. Rostami E, Krueger F, Zoubak S, et al. BDNF polymorphism predicts general intelligence after penetrating traumatic brain injury. *PLoS One* 2011;6:e27389.
153. Lanctot KL, Rapoport MJ, Chan F, et al. Genetic predictors of response to treatment with citalopram in depression secondary to traumatic brain injury. *Brain Inj* 2010;24:959-969.

154. Pardini M, Krueger F, Hodgkinson C, et al. Prefrontal cortex lesions and MAO-A modulate aggression in penetrating traumatic brain injury. *Neurology* 2011;76:1038-1045.
155. Kors EE, Terwindt GM, Vermeulen FL, et al. 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;49:753-760.
156. McDevitt JK, Tierney RT, Mansell JL, et al. Neuronal structural protein polymorphism and concussion in college athletes. *Brain Inj* 2011;25:1108-1113.
157. Romeiro RR, Romano-Silva MA, De Marco L, Teixeira AL, Jr., Correa H. Can variation in aquaporin 4 gene be associated with different outcomes in traumatic brain edema? *Neurosci Lett* 2007;426:133-134.
158. Robertson CS, Gopinath SP, Valadka AB, Van M, Swank PR, Goodman JC. Variants of the endothelial nitric oxide gene and cerebral blood flow after severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2011;28:727-737.
159. Krueger F, Pardini M, Huey ED, et al. The role of the Met66 brain-derived neurotrophic factor allele in the recovery of executive functioning after combat-related traumatic brain injury. *J Neurosci* 2011;31:598-606.
160. Bagnato S, Minafra L, Bravata V, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor (Val66Met) Polymorphism Does Not Influence Recovery from a Post-Traumatic Vegetative State: A Blinded Retrospective Multi-Centric Study. *J Neurotrauma* 2012;29:2050-2059.
161. McAllister TW, Tyler AL, Flashman LA, et al. Polymorphisms in the brain-derived neurotrophic factor gene influence memory and processing speed one month after brain injury. *J Neurotrauma* 2012;29:1111-1118.
162. Scher AI, Wu H, Tsao JW, et al. MTHFR C677T genotype as a risk factor for epilepsy including post-traumatic epilepsy in a representative military cohort. *J Neurotrauma* 2011;28:1739-1745.
163. Chuang PY, Conley YP, Poloyac SM, et al. Neuroglobin genetic polymorphisms and their relationship to functional outcomes after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2010;27:999-1006.
164. Hoh NZ, Wagner AK, Alexander SA, et al. BCL2 genotypes: functional and neurobehavioral outcomes after severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2010;27:1413-1427.
165. Sarnaik AA, Conley YP, Okonkwo DO, et al. Influence of PARP-1 polymorphisms in patients after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2010;27:465-471.

166. Wagner AK, Miller MA, Scanlon J, Ren D, Kochanek PM, Conley YP. Adenosine A1 receptor gene variants associated with post-traumatic seizures after severe TBI. *Epilepsy Res* 2010;90:259-272.
167. Wagner AK, Hatz LE, Scanlon JM, et al. Association of KIBRA rs17070145 polymorphism and episodic memory in individuals with severe TBI. *Brain Inj* 2012.
168. Darrah SD, Miller MA, Ren D, et al. Genetic variability in glutamic acid decarboxylase genes: Associations with post-traumatic seizures after severe TBI. *Epilepsy Res* 2012.
169. Xiao HD, Fuchs S, Frenzel K, Teng L, Bernstein KE. Circulating versus local angiotensin II in blood pressure control: lessons from tissue-specific expression of angiotensin-converting enzyme (ACE). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14:137-145.
170. Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 1987;56:345-348.
171. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 2004;116:263-272.
172. Carluccio M, Soccio M, De Caterina R. Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system. *Eur J Clin Invest* 2001;31:476-488.
173. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916-1923.
174. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem* 1993;268:9496-9503.
175. Yokosawa H, Endo S, Ogura Y, Ishii S. A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: hydrolysis of substance P. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;116:735-742.
176. Lantz I, Thornwall M, Kihlstrom JE, Nyberg F. A comparison of human lung, brain, CSF and plasma angiotensin-converting enzyme with regard to neuropeptide metabolism. *Biochem Int* 1992;26:415-426.
177. Mellick GD, Buchanan DD, McCann SJ, et al. The ACE deletion polymorphism is not associated with Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1999;41:103-106.
178. Hong CJ, Wang YC, Tsai SJ. Association study of angiotensin I-converting enzyme polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. *J Neural Transm* 2002;109:1209-1214.

179. Arinami T, Li L, Mitsushio H, Itokawa M, Hamaguchi H, Toru M. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene is associated with both brain substance P contents and affective disorders. *Biol Psychiatry* 1996;40:1122-1127.
180. Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J Biol Chem* 2001;276:47863-47868.
181. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 1993; 290(Pt 1):33–40.
182. El-Dorry HA, Pickett CB, MacGregor JS, Soffer RL. Tissue-specific expression of mRNAs for dipeptidyl carboxypeptidase isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:4295-4297.
183. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991;266:15377-15383
184. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-1346.
185. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992;51:197-205.
186. Narain Y, Yip A, Murphy T, et al. The ACE gene and Alzheimer's disease susceptibility. *J Med Genet* 2000;37:695-697.
187. Elkins JS, Douglas VC, Johnston SC. Alzheimer disease risk and genetic variation in ACE: a meta-analysis. *Neurology* 2004;62:363-368.
188. Kristman VL, Tator CH, Kreiger N, et al. Does the apolipoprotein epsilon 4 allele predispose varsity athletes to concussion? A prospective cohort study. *Clin J Sport Med* 2008;18:322-328.
189. Quinn TJ, Smith C, Murray L, Stewart J, Nicoll JA, Graham DI. There is no evidence of an association in children and teenagers between the apolipoprotein E epsilon4 allele and post-traumatic brain swelling. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004;30:569-575.
190. Lambert JC, Mann D, Goumidi L, et al. Effect of the APOE promoter polymorphisms on cerebral amyloid peptide deposition in Alzheimer's disease. *Lancet* 2001;357:608-609.

191. Ariza M, Matarin MD, Junque C, et al. 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.
192. Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J Biol Chem* 2001;276:47863-47868.
193. Gauderman WJ. Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *Am J Epidemiol.* 2002;155:478–484
194. Carter KW, McCaskie PA, Palmer LJ. SimHap GUI: An intuitive graphical user interface for genetic association analysis. *BMC Bioinformatics* 2008;25(9):557.
195. Li Z, Zhang Z, He Z, Tang W, Li T, Zeng Z, He L, Shi Y. A partition-ligationcombination- subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>). *Cell Res* 2009; 19:519-523.
196. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, Van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995; 92:1387–1388.
197. Thompson & Thompson, *Ιατρική γενετική, 2η Έκδοση, Αθήνα, Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ Α.Ε., 2011:240-254,264-269*
198. Redl H, Gasser H, Schlag G, Marzi I. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *Br Med Bull* 1993; 49:556-65.
199. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993; 49:577-87.
200. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255:H1269-75.
201. Paul M, Bader M, Steckelings UM, Voigtlaender T, and Ganten D. The renin-angiotensin system in the brain: localization and functional significance. *Arzneim-Forsch Drug Res* 43: 207–213, 1993.
202. Michael P. Epstein and Glen A. Satten, *Inference on Haplotype Effects in Case-Control Studies Using Unphased Genotype Data. Am. J. Hum. Genet. 73:1316–1329, 2003*
203. Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J, *Ανοσολογία, 2η Ελληνική Έκδοση, Nicosia, Cyprys, BROKEN HILL PUBLISHERS LTD, 2013:66-70.*
204. Dardiotis, E., Fountas, K.N., Dardioti, M., Xiromerisiou, G., Kapsalaki, E., Tasiou, A. and Hadjigeorgiou, G.M. Genetic association studies in patients with traumatic brain injury. *Neurosurg Focus.* 2010;28(1):E9.

205. Hadjigeorgiou, G.M., Paterakis, K., Dardiotis, E., Dardioti, M., Aggelakis, K., Tasiou, A., Xiromerisiou, G., Komnos, A., Zintzaras, E., Scarmeas, N., Papadimitriou, A. and Karantanas, A. IL-1RN and IL-1B gene polymorphisms and cerebral hemorrhagic events after traumatic brain injury. *Neurology* 2005;65:1077-82.
206. Dardiotis, E., Dardioti, M., Hadjigeorgiou, G.M. and Paterakis, K. (2006). 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* 66, 334-335.
207. Teasdale G, Murray G, Parker L, Jennett B. Adding up the Glasgow Coma Score. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1979;28(1):13–16
208. Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet* 1997;350:1069-1071.
209. Dardiotis, E., Jagiella, J., Xiromerisiou, G., Dardioti, M., Vogiatzi, C., Urbanik, A., Paterakis, K., Komnos, A., Fountas, K.N., Slowik, A. and Hadjigeorgiou, G.M. Angiotensin-converting enzyme tag single nucleotide polymorphisms in patients with intracerebral hemorrhage. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21:136-41.
210. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl* 1993;3:120-121.
211. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev* 2002; 39:55-73.
212. Λογοθέτης, Ιωάννης, Α., Μυλωνάς, Ιωάννης, Α., *Νευρολογία*, 4η Έκδοση, Θεσσαλονίκη, University Studio Press A.E., 2004:132,270-271.
213. Strittmatter SM, Thiele EA, Kapiloff MS, Snyder SH. A rat brain isozyme of angiotensin-converting enzyme. Unique specificity for amidated peptide substrates. *J Biol Chem* 1985;260:9825-9832.
214. Klatzo, I. Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1994;60, 3-6.
215. Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg.Focus.* 2007;22(5):E2.
216. Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J.* 2004;18:1291–1293
217. Donkin JJ, Vink R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr Opin Neurol.* 2010;23:293–299.
218. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006;86 (3):747–803.

219. Γιγής Παναγιώτης, Παρασκευάς Γεώργιος, *Νευροανατομία, Κεντρικό Νευρικό Σύστημα*, 1η Έκδοση, Θεσσαλονίκη, University Studio Press A.E., 1999:292.
220. Ishman SL, Friedland DR. Temporal bone fractures: traditional classification and clinical relevance. *Laryngoscope*. 2004 Oct;114(10):1734
221. McIntosh TK. Neurochemical sequelae of traumatic brain injury: therapeutic implications. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994; 6:109-62.
222. 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.
223. Fleegal-DeMotta, M.A., Doghu, S., Banks, W.A. Angiotensin II modulates BBB permeability via activation of the AT(1) receptor in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:640–647
224. Hajdu, M.A., Heistad, D.D., Ghoneim, S., Baumbach, G.F. Effects of antihypertensive treatment on composition of cerebral arterioles. *Hypertension* 1991;18 (Suppl. II):1115–1121.
225. Nag, S., Kilty, D.W. Cerebrovascular changes in chronic hypertension. Protective effects of enalapril in rats. *Stroke*, 1997;28: 1028-1034
226. Yabuuchi F. Takahashi M. Aritake K. Fujimoto M. Ito H. Tsuzaki M. Akai T. Yamaguchi M. Hayashi S. Nishino Y. Brautigam M. Post-stroke treatment with imidapril reduces learning deficits with less formation of brain oedema in a stroke-prone substrain of spontaneously hypertensive rats. *Fund. Clin. Pharmacol.* 1999;13(4):475–483.
227. Nishimura Y, Ito T, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2000;31:2478–2486
228. Wallesch CW, Curio N, Galazky I, et al: The neuropsychology of blunt head injury in the early postacute stage: effects of focal lesions and diffuse axonal injury. *J Neurotrauma* 2001; 18:11–20
229. Marion DW, Darby J, Yonas H: Acute regional cerebral blood flow changes caused by severe head injuries. *J Neurosurg* 1991; 74:407–414
230. Zubkov AY, Pilkington AS, Bernanke DH, et al: Posttraumatic cerebral vasospasm: clinical and morphological presentations. *J Neurotrauma* 1999; 16:763–770
231. Stenman E, Edvinsson L: Cerebral ischemia enhances vascular angiotensin AT1 receptor-mediated contraction in rats. *Stroke* 2004; 35:970–974
232. Andrews P, Papadakis N, Gavras H: Reversal of experimental acute cerebral vasospasm by angiotensin converting enzyme inhibition. *Stroke* 1982; 13:480–483

233. Postiglione A, Bobkiewicz T, Vinholdt-Pedersen E, et al: Cerebrovasculareffects of angiotensin converting enzyme inhibition involve large artery dilatation in rats. *Stroke* 1991; 22:1363–1368
234. Baranov D, Armstead WM: Selective blockade of AT1 receptor attenuates impairment of hypotensive autoregulation and improves cerebral blood flow after brain injury in the newborn pig. *Anesthesiology* 2003; 99:1118–1124
235. Yanai K, Saito T, Kakinuma Y, Kon Y, Hirota K, Taniguchi-Yanai K, Nishijo N, Shigematsu Y, Horiguchi H, Kasuya Y, Sugiyama F, Yagami K, Murakami K, and Fukamizu A. Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J Biol Chem.* 2000;275:5–8
236. Kakinuma Y, Hama H, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Murakami K, Fukamizu A: Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nat Med* 1998, 4:1078-1080
237. Monti J, Schinke M, Bohm M, Ganten D, Bader M, Bricca G. Glial angiotensinogen regulates brain angiotensin II receptors in transgenic rats TGR(ASrAOGEN). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280:R233–R240.
238. Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology.* 2001;57:1153–1154.
239. Wilson, J.T. Assessing outcome in head injury trials. *Curr Pharm Des* 7, 2001; 1537-1552.
240. Hamdi HK, Castellon R. A genetic variant of ACE increases cell survival: a new paradigm for biology and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318:187–191.
241. 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.
242. 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.