



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

**«Ο ρόλος του πολυμορφισμού ACE I/D στο
φαινότυπο ασθενών με κληρονομικό αγγειοίδημα»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ Ι. ΧΑΤΕΔΑΚΗ

Ιατρός

Επιβλέπων Καθηγητής:

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Ε. ΓΕΡΜΕΝΗΣ

Καθηγητής Ανοσολογίας - Ιστοσυμβατότητας

Ευχαριστίες

Η διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Με πολύ εκτίμηση, θα ήθελα πάνω από όλους, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας κ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή και διευθυντή του Εργαστηρίου, που με δέχτηκε ως μέλος του Εργαστηρίου, πίστεψε σε μένα και μου έδινε δύναμη να προσπαθώ συνεχώς για κάτι ανώτερο, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας κ. Ματθαίο Σπελέτα, που χωρίς την αμέριστη και αδιάκοπη βοήθειά του δεν θα είχε ολοκληρωθεί η εργασία αυτή. Ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, θα ήθελε να ευχαριστήσω για την συμμετοχή του και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας κ. Γεώργιο Χατζηγεωργίου.

Ανεκτίμητη υπήρξε η βοήθεια που μου προσέφερε η μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αβραμούλη Αντιγόνη, καθώς ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής δουλειάς μου. Ευχαριστώ επίσης τους διδακτορικούς φοιτητές του Εργαστηρίου Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Νικολέτα Αργέντου και Αντιγόνη Μαμάρα, καθώς και των υπολοίπων μελών του εργαστηρίου που μου έμαθαν να εργάζομαι ως μέλος ενός τόσο άρτια οργανωμένου εργαστηρίου. Θα ήθελα να σταθώ ιδιαίτερα και να ευχαριστήσω την Ευαγγελία Καραμούτη, τεχνολόγο του εργαστηρίου, για την ηθική και πρακτική υποστήριξη της προσπάθειας αυτής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που είναι δίπλα μου, τον σύζυγό μου, τα δύο παιδιά μου και την υπόλοιπη οικογένειά μου, που με υπέρμετρη υπομονή με στήριξαν στην προσπάθειά μου αυτή και με παροτρύνουν σε κάθε βήμα της εκπαίδευσής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ	7
1. Α. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	9
1. Β. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	15
1. Γ. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	17
2. ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΟ ΑΓΓΕΙΟΤΑΣΙΝΗΣ (ACE)	19
3. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ACE ΚΑΙ ΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ	21
4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ACE I/D ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ	25
4. Α. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	26
4. Β. ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΝΕΦΡΩΝ	27
4. Γ. ΑΛΛΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ	28
5. ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ACE ^I ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ	29
6. ΣΚΟΠΟΣ	31
7. ΥΛΙΚΟ	32
8. ΜΕΘΟΔΟΙ	34
8. Α. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	34
8. Β. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	35
8. Γ. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	36
8. Δ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	37
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

Συντομογραφίες

ACE	Angiotensin converting enzyme
Ang I	Angiotensin I
RAS	Renin- Angiotensin system
KKS	Kinine- Kallikrein system
Ang II	Angiotensin II
AD	Alzheimer disease
NBCI	National Center for Biotechnology Information
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
sACE	Somatic ACE
gACE	Germinal ACE
I	Insertion
D	Deletion
QTLs	Quantitative trait loci
LD	Linkage disequilibrium
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
I.E.E	Ισχαιμικό Εγκεφαλικό Επεισόδιο
MI	Myocardial infraction
IgAN	IgA Νεφροπάθειας
ΙΝΣ	Ιδιοπαθές Νεφρωσικό Σύνδρομο
FSGS	Focal Segmental Glomerulosclerosis
BPD	Bronchopulmonary Dysplasia
OSA	Obstructive Sleep Apnea
LVH	Left ventricular hypertrophy
BMI	Body mass index
ΚΑΟ	Κληρονομικό Αγγειοίδημα
EAO	Επίκτητο Αγγειοίδημα
C1-Inh	C1-Inhibitor
Σ.Ε.Λ	Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
HUVS	Hypocomplementaimia Uricarial Vasculitis Syndrome
AE-ACEi	Angiotensin Converting Enzyme inhibitor- induced Angioedema

APP

B2BKR

PCR

LT-treatment

LAR ATT

Abd attacks

CI

M.O

Aminopeptidase P

B2 Bradykinine Receptor

Polymerase Chain Reaction

Long- Term treatment

Larynx Attacts

Abdominal attacts

Confidence Interval

Μέσος Όρος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το κληρονομικό αγγειοίδημα (ΚΑΟ) προέρχεται από γενετική ανεπάρκεια του C1-Inhibitor και χαρακτηρίζεται από αυτομάτως υφιόμενα επεισόδια οιδημάτων των υποδόριων ιστών και των βλεννογόνων του εντέρου και των ανώτερων αναπνευστικών οδών, πολλές φορές απειλητικά για τη ζωή. Παρόλο που έχουν περιγραφεί περίπου 200 γενετικές βλάβες μέχρι τώρα του γονιδίου που κωδικοποιεί τον C1-Inhibitor, *SERPING1*, (HAEdb, <http://hae.enzim.hu.php>) (1,2), η πολυπλοκότητα της κλινικής εικόνας της νόσου δεν επιτρέπει την πλήρη κατανόηση της παθογένεσης της νόσου. Ο χαρακτήρας και η εντόπιση των μεταλλάξεων παρέχουν μέχρι τώρα, μόνο πληροφορίες για τον τύπο του ΚΑΟ (τύπου I ή II). Επειδή λοιπόν είναι περιορισμένη η συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ μεταλλάξεων και κλινικού φαινοτύπου της νόσου, υποθέτουμε ότι άλλοι γενετικοί παράγοντες, έξω από το γονίδιο του *SERPING1*, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κλινική εικόνα της νόσου.

Στην ανάπτυξη του αγγειοιδήματος συμμετέχουν τόσο το σύστημα του συμπληρώματος όσο και το σύστημα επαφής. Υποστηρίζεται ότι η βραδυκινίνη, η C2-κινίνη και η αναφυλατοξίνη C3a παίζουν ρόλο στην εκδήλωση αγγειοιδήματος (3), καθώς έχει βρεθεί αύξηση της βραδυκινίνης πλάσματος ασθενών με ΚΑΟ κατά την διάρκεια της κρίσης (4).

Στον καταβολισμό όμως της βραδυκινίνης, γνωρίζουμε ότι συμμετέχει μέσω του συστήματος Κινίνης-Καλλικρεΐνης και το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (ACE). Ο πολυμορφισμός εισαγωγή/ έλλειψη (insertion/ deletion, I/ D) του ιντρονίου 16, στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ACE έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει το καταβολισμό της βραδυκινίνης, δηλαδή επί ύπαρξης D αλληλίου αυξάνεται ο καταβολισμός συγκριτικά με το I αλληλίο (5).

Επομένως στην μελέτη μας θέλαμε να ερευνήσουμε πιθανή συσχέτιση του ACE I/D πολυμορφισμού με το κλινικό φαινότυπο του κληρονομικού αγγειοιδήματος από ανεπάρκεια C1-Inhibitor.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ

Αιτιολογία

Το αγγειοίδημα διακρίνεται στο **κληρονομικό αγγειοοίδημα (ΚΑΟ)** και στο **επίκτητο αγγειοοίδημα (ΕΑΟ)**. Ανάλογα με το είδος της υποκείμενης διαταραχής, έχουμε την διάκριση των αγγειοοιδημάτων (πίνακας 1, Borg et al., Zuraw et al., 6,7).

Η ανεπάρκεια του C1-Inh ευθύνεται για το 15% του συνόλου των αγγειοοιδημάτων και ως επί το πλείστον είναι κληρονομική. Το κληρονομικό αγγειοοίδημα κληρονομείται ως επικρατών σωματικός χαρακτήρας. Το **ΚΑΟ τύπου I** χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη σύνθεση C1-Inh, τα αντιγονικά και τα λειτουργικά επίπεδα του οποίου στον ορό των ασθενών είναι ελαττωμένα. Τα επίπεδα του παράγοντα C4 του συμπληρώματος παρουσιάζονται ελαττωμένα στον ορό και αυτό αποτελεί διαγνωστικό δείκτη. Ο τύπος αυτός αντιπροσωπεύει το 85% των περιπτώσεων με ΚΑΟ. Έχουν ανιχνευτεί πολλαπλές μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον C1-Inh, *SERPING1*, σε περιοχές που είναι απαραίτητες για τη σωστή μεταγραφή ή μετάφραση (8).

Στο **ΚΑΟ τύπου II** ανιχνεύονται στον ορό φυσιολογικά αντιγονικά αλλά χαμηλά λειτουργικά επίπεδα C1-Inh. Πιθανό να οφείλεται και αυτό σε μεταλλάξεις του *SERPING1* ενώ τα επίπεδα C4 παράγοντα του συμπληρώματος επηρεάζονται.

Το **ΚΑΟ του παράγοντα XIII**, (ή τύπου III), οφείλεται σε μεταλλάξεις του παράγοντα XIII (FXIII), δύο γνωστές μεταλλάξεις υπάρχουν στο γονίδιο του FXIII (Thr309Lys, Thr309Arg). Ο τύπος αυτός φαίνεται ότι έχει εξάρτηση από το ορμονικό σύστημα, καθώς έχει παρατηρηθεί η εκδήλωσή του σε γυναίκες κατά την περίοδο της κύησης ή μετά από θεραπεία με οιστρογόνα, ενώ τα επίπεδα του C4 παράγοντα δεν μεταβάλλονται. Τέλος το **ΚΑΟ άγνωστης αιτιολογίας** παρουσιάζει φυσιολογικά επίπεδα λειτουργικότητας του C1-Inh ενώ δεν παρατηρήθηκε μετάλλαξη στον FXIII (9,10).

Το **ΕΑΟ** αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1969 και μέχρι σήμερα οι περιπτώσεις που έχουν ανακοινωθεί είναι λίγες και χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια

C1-Inh σε ενήλικους που δεν έχουν ανάλογη κληρονομική επιβάρυνση (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Τύποι αγγειοιδήματος.

Κληρονομικό αγγειοίδημα	
Τύπου I	Μεταλλάξεις του <i>SERPING1</i> , χαμηλά αντιγονικά και λειτουργικά επίπεδα C1-Inh
Τύπου II	Μεταλλάξεις του <i>SERPING1</i> , φυσιολογικά αντιγονικά, αλλά χαμηλά λειτουργικά επίπεδα C1-Inh
ΚΑΟ του παράγοντα XII	Μεταλλάξεις στον παράγοντα XII, οιστρογονοεξαρτώμενο
ΚΑΟ άγνωστης αιτιολογίας	Χωρίς γνωστή γενετική αιτία, φυσιολογικός C1-Inh
Επίκτητο αγγειοίδημα	
Τύπου I	Ανεπάρκεια C1-Inh, παρανεοπλασματικό, αυξημένος καταβολισμός του C1-Inh
Τύπου II	Ανεπάρκεια C1-Inh, σχετιζόμενο με αυτοάνοσες διαταραχές, αυτοαντισώματα έναντι του C1-Inh
Επαγόμενο από ACEi	
Επαγόμενο από άλλα φάρμακα	

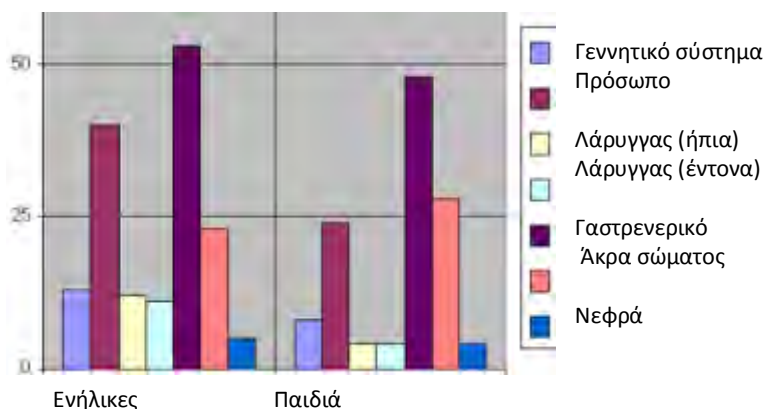
Το **ΕΑΟ τύπου I** εμφανίζεται σε ασθενείς με καλοήθειες ή κακοήθειες λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές της Β σειράς (λεμφοσάρκωμα, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, μακροσφαιριναιμία, πολλαπλούν μυέλωμα, αληθή κρουοσφαιριναιμία) και η εκδήλωσή του προηγείται πολλά χρόνια πριν από την κλινική εκδήλωση των διαταραχών αυτών. Μεταβολικές μελέτες έδειξαν ότι ο καταβολικός ρυθμός του C1-Inh, αλλά και του C1q, είναι αυξημένος, ενώ η σύνθεση του C1-Inh σχεδόν φυσιολογική. Στους ίδιους ασθενείς ανιχνεύονται κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα τα οποία στρέφονται έναντι μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης που εκφράζεται στην επιφάνεια των Β-λεμφοκυττάρων τους ή στο κυτταρόπλασμα των μυελικών κυττάρων τους. Φαίνεται ότι ο αυξημένος καταβολισμός του C1q είναι αποτέλεσμα της σύνδεσής του με τα σχηματιζόμενα ανοσοσυμπλέγματα. Η ενεργοποίηση του C1 που προκύπτει από αυτή την σύνδεση, συνεπάγεται ανάλογη κατανάλωση του C1-Inh.

Το **ΕΑΟ τύπου II** εμφανίζεται σε υγιή, κατά τα άλλα άτομα, ή συνοδεύει άλλα νοσήματα κυρίως αυτοάνοσα (αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία). Χαρακτηριστικό του τύπου αυτού είναι η παρουσία στον ορό αυτοαντισωμάτων έναντι του C1-Inh. Τα αντισώματα στρέφονται κατά επιτόπων στο ενεργό κέντρο του μορίου της πρωτεΐνης και η σύνδεσή τους με αυτό οδηγεί σε αδρανοποίηση του C1-Inh και εκδήλωση της νόσου (9).

1.Α. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Ανεξάρτητα από την αιτιολογία του (επίκτητο ή κληρονομικό), η **κλινική εικόνα του αγγειοοιδήματος** χαρακτηρίζεται από αυτομάτως υφιέμενα επεισόδια οιδημάτων των υποδόριων ιστών και των βλεννογόνων του εντέρου και των ανώτερων αναπνευστικών οδών (11) (εικόνα 3). Η εκδήλωση των συμπτωμάτων διαφέρει μεταξύ των πασχόντων, τόσο ως προς το συνδυασμό των συμπτωμάτων όσο και ως προς την έντασή τους (εικόνα 2) (12,13).

Το **οίδημα του λάρυγγα** αποτελεί το σοβαρότερο σύμπτωμα του αγγειοοιδήματος από ανεπάρκεια C1-Inh. Συνήθως εισβάλλει βαθμιαία με αλλοίωση της φωνής και δυσφαγία, ενώ καταλήγει σε πλήρη απόφραξη της αναπνευστικής οδού. Ευθύνεται για 20-50% των θανάτων που έχουν συμβεί σε αδιάγνωστες περιπτώσεις, ενώ στο 2-16% των ασθενών επιβάλλεται διενέργεια τραχειοτομής (14). Οι ασθενείς συχνά αναφέρουν οίδημα λάρυγγα ταχέως εξελισσόμενο ακόμα και μέσα σε χρονικό διάστημα 20' (15). Η ενδεχόμενη εμφάνιση οιδήματος του λάρυγγα σε ασυμπτωματικά μέλη της οικογένειας των πασχόντων, συνήθως κατά την διάρκεια ή μετά από επεμβάσεις στην περιοχή του στόματος, επιβάλλει τον προληπτικό έλεγχο για αποκάλυψη και ενημέρωση των συγγενών που παρουσιάζουν την ανεπάρκεια.



ΕΙΚΟΝΑ 2. Συχνότητα των κλινικών χαρακτηριστικών του αγγειοοιδήματος από ανεπάρκεια του C1-INH στους ενήλικες και τα παιδιά.

Η **προσβολή του γαστρεντερικού σωλήνα** προκαλεί τα πιο δυσάρεστα συμπτώματα της νόσου. Χαρακτηρίζεται από οξύ κωλικοειδές άλγος, ναυτία, έμετο, σπανιότερα διάρροια ή παροδικό ειλεό. Ο έμετος μπορεί να είναι τόσο έντονος, ώστε λόγω και της συνυπάρχουσας αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, να

προκαλέσει μεγάλη απώλεια υγρών από των αγγειακό χώρο και σημαντικού βαθμού αιμοσυμπύκνωση (λευκοκυττάρωση). Τα συμπτώματα αυτά συνοδεύονται από διάταση της κοιλίας σε μεγάλο βαθμό. Ενδέχεται επίσης να εμφανιστεί χαμηλή πυρετική κίνηση.

Στην απλή ακτινογραφία κοιλίας παρατηρείται κατά τμήματα πάχυνση των πτυχών του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου, που δίνει στις προσβεβλημένες περιοχές την εικόνα δακτυλικού αποτυπώματος ή επισωρευμένων νομισμάτων, καθώς και την απόθεση των ελίκων μεταξύ τους, λόγω του οιδήματος του εντερικού τοιχώματος (16). Πολλοί ασθενείς οδηγούνται με αυτά τα συμπτώματα στον γαστρεντερολόγο, ενώ αρκετοί χειρουργούνται με λαθεμένη διάγνωση σκωληκοειδίτιδας, περιτονίτιδας, της χολολιθίασης ή ειλεού. Οι κρίσεις διαρκούν συνήθως 36-48 ώρες και υποχωρούν θεαματικά. Οι ασθενείς αντιλαμβάνονται ξαφνικά την ύφεση των συμπτωμάτων και μπορούν να πάρουν υγρά (17,18).

Το **υποδόριο οίδημα** είναι σκληρό, περιγεγραμμένο, δεν συνοδεύεται από πόνο και διαρκεί 2-5 ημέρες. Μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε σημείο του σώματος, αλλά συνηθέστερα εντοπίζεται στα άκρα. Στην πλήρη έκφραση του υποδόριου οιδήματος δεν καταλείπετε εντύπωμα κατά την πίεση, τα βλέφαρα δεν μπορούν να ανοίξουν και τα δάκτυλα είναι αδύνατο να πλησιάσουν μεταξύ τους (εικόνα 3). Της εμφανίσεως του οιδήματος προηγείται συνήθως αίσθημα τάσεως των υποδόριων ιστών ή ερπητόμορφη διάσφιξη του δέρματος στις αντίστοιχες περιοχές (19,20).

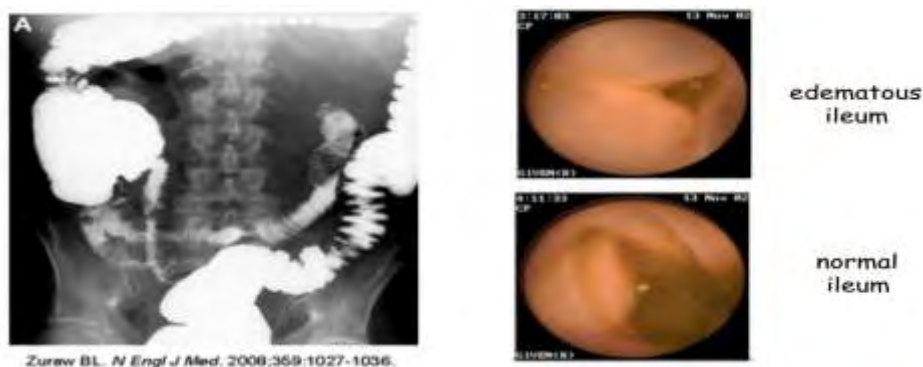
Η **ηλικία εμφάνισης** του ΚΑΟ ποικίλει ευρύτατα. Συνήθως εμφανίζεται για πρώτη φορά κατά την παιδική ηλικία (μέση ηλικία εμφάνισης 8-12 έτη) (21), με ήπια συμπτώματα, χωρίς όμως να αποκλείονται και τα σοβαρά επεισόδια. Η ηλικία έναρξης σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου, μια και όσο μικρότερη η ηλικία τόσο βαρύτερη κατά κανόνα η πρόγνωση (11). Επομένως η ηλικία έναρξης είναι ο σημαντικότερος γνωστός προγνωστικός δείκτης της νόσου. Τα σοβαρότερα επεισόδια παρατηρούνται κατά την εφηβεία, ενώ προϊούσης της ηλικίας τόσο η βαρύτητα όσο και η συχνότητα των επεισοδίων ελαττώνονται, μέχρις εξαφανίσεως κατά το 60^ο έτος. Η εντόπιση των κρίσεων (λάρυγγας ή κοιλιακή χώρα) δεν επηρεάζεται από την ηλικία έναρξης της νόσου. Το ΕΑΟ εμφανίζεται όπως είναι αναμενόμενο σε μεγάλη ηλικία.

Η **συχνότητα εμφάνισης των κρίσεων** ΚΑΟ ποικίλει, από ένα επεισόδιο τη βδομάδα έως λιγότερο από ένα το χρόνο (12). μεγάλες διαφορές στην συχνότητα των επεισοδίων υπάρχουν ακόμα και σε μέλη οικογενειών με την ίδια

μετάλλαξη του γονιδίου του C1- inhibitor. Σε μερικές γυναίκες παρουσιάζουν επιδείνωση κατά την διάρκεια της εμμήνου ρύσεως, ενώ στις περισσότερες τα επεισόδια εξαφανίζονται κατά την εμμηνόπαυση. Πολυμορφισμοί έξω από το γονίδιο του C1- inhibitor (όπως γονίδια του συστήματος επαφής), περιβαλλοντικοί παράγοντες (όπως το συναισθηματικό stress και οι λοιμώξεις), τραυματικά αίτια και ορμόνες επηρεάζουν τη συχνότητα και τη σοβαρότητα των επεισοδίων ΚΑΟ. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η εμφάνιση οιδήματος στο λάρυγγα μετά από οδοντιατρικές επεμβάσεις, που συνήθως εκλαμβάνεται ως αλλεργική αντίδραση από αναισθητικό (12, 22-27).



ΕΙΚΟΝΑ 3. Κλινική εικόνα αγγειοοιδήματος. Τυπική εικόνα οιδήματος του προσώπου και των άνω άκρων.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Οίδημα του βλεννογόνου του εντέρου ακτινογραφικά.

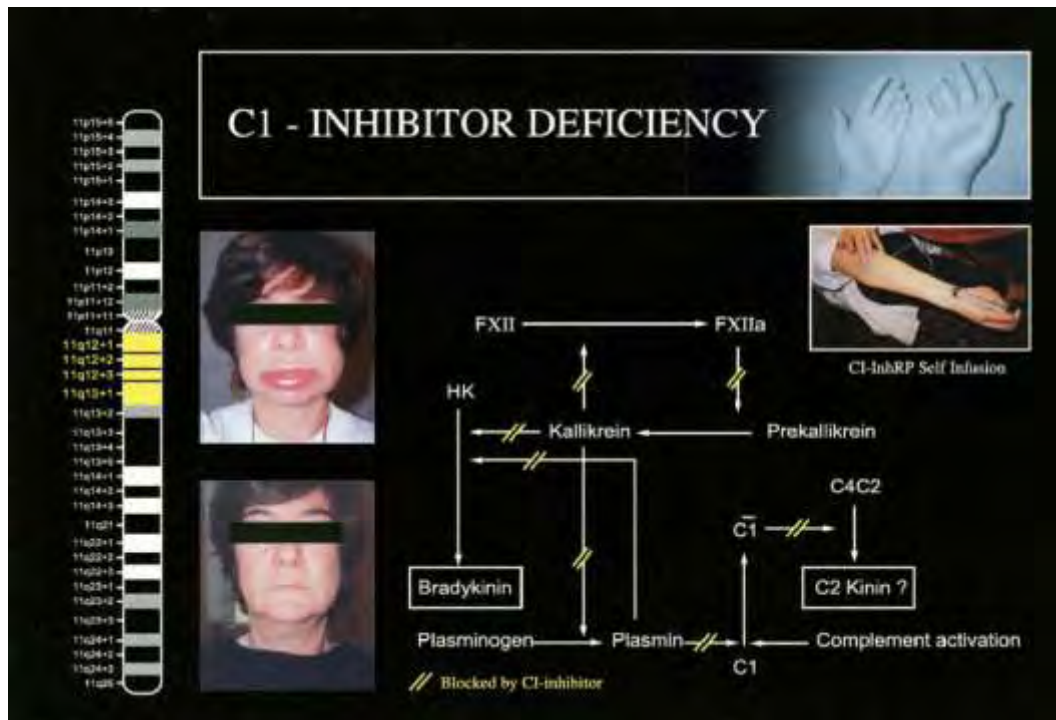
Μοριακή ανάλυση ΚΑΟ από Ανεπάρκεια C1-Inh

Το κληρονομικό αγγειοίδημα από ανεπάρκεια του C1-Inh (τύπου I και II) κληρονομείται με σωματικό επικρατές χαρακτήρα, επομένως οι ασθενείς είναι ετεροζυγώτες, πλιν εξαιρέσεων, δηλαδή άτομα με γονείς που είναι και οι δύο πάσχοντες.

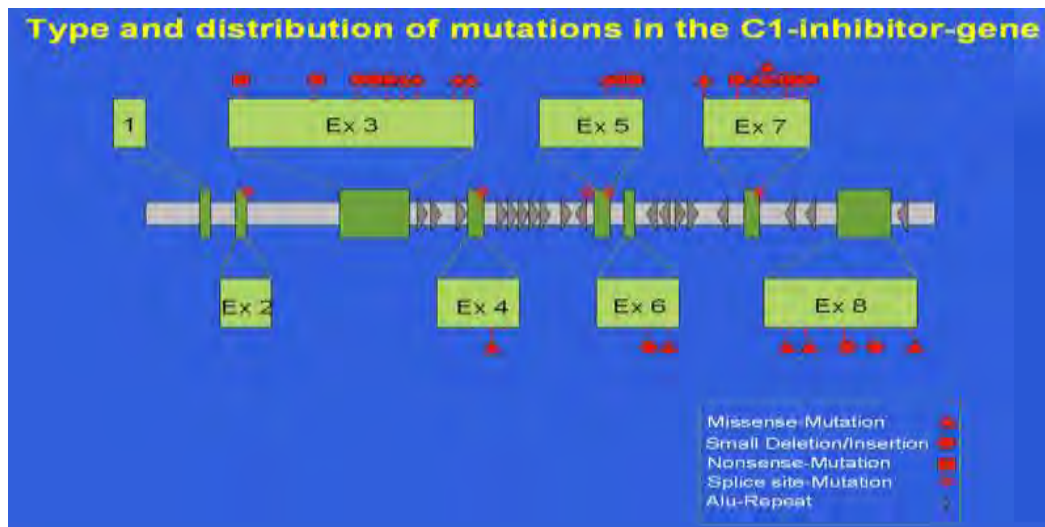
Η ετερογένεια του δυσλειτουργικού C1-Inh, στον οποίο οφείλεται το κληρονομικό αγγειοίδημα (τύπου I και II), φαίνεται ότι είναι συνέπεια διαφορετικών σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1* (GenBank X54486; Swiss-Prot P05155), το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 στο μακρύ σκέλος q11-q13.1 (εικόνα 5, Bowen et al, 39). Αυτό το γονίδιο χαρακτηρίζεται από την παρουσία συχνών επαναλήψεων της αλληλουχίας Alu στα ιντρόνια . αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές γενετικές αλλαγές και με διαφορετική συχνότητα, συμπεριλαμβανομένου διπλασιασμούς, ελλείψεις, αντιμεταθέσεις και εισαγωγές, προσδίδοντας στο γονίδιο γενετική αστάθεια (28,29).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού που καταγράφηκαν, περίπου διακόσιες έως τώρα (HAEdb, <http://hae.enzim.hu.php>), διαφέρουν μεταξύ των δύο τύπων ΚΑΟ. Στο ΚΑΟ τύπου I παρουσιάζουν μεγαλύτερη ετερογένεια, βρίσκονται κατά μήκος όλου του γονιδίου *SERPING1* και περιλαμβάνουν μεγάλους ανασυνδιασμούς τμημάτων, τμηματικές ελλείψεις και διπλασιασμούς πιο σπάνια. Αντίθετα στο ΚΑΟ τύπου II οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στο εξόνιο 8 και αφορούν το ενεργό κέντρο του C1-Inh (30-33) (εικόνα 6)

Στο πίνακα 7 αναγράφονται τα είδη των γενετικών βλαβών του γονιδίου *SERPING1* που έχουν μελετηθεί και το ποσοστό εμφάνισης τους σε ασθενείς με ΚΑΟ γενικά, ενώ στην εικόνα 6 φαίνεται και η εντόπιση των περισσότερων από αυτών. Είναι εντυπωσιακό ότι οι βλάβες διαφέρουν και μεταξύ ατόμων των ίδιων οικογενειών (34). Παρόλο που έχουν περιγραφεί περίπου τόσες γενετικές βλάβες μέχρι τώρα του *SERPING1*, η πολυπλοκότητα της κλινικής εικόνας της νόσου δεν επιτρέπει την πλήρη κατανόηση της παθογένεσης της νόσου. Ο χαρακτήρας και η εντόπιση των μεταλλάξεων παρέχουν μέχρι τώρα, μόνο πληροφορίες για τον τύπο του ΚΑΟ (τύπου I ή II). Επειδή λοιπόν είναι περιορισμένη η συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ μεταλλάξεων με τον κλινικό φαινότυπο της νόσου υποθέτουμε ότι άλλοι γενετικοί παράγοντες, έξω από το γονίδιο του *SERPING1*, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κλινική εικόνα της νόσου.



ΕΙΚΟΝΑ 5. ΚΑΟ από ανεπάρκεια C1-Inh. Εντόπιση υπεύθυνου γονιδίου *SERPING1* στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 11, κλινική εικόνα ασθενούς με οίδημα προσώπου, παθογένεση και θεραπεία.



ΕΙΚΟΝΑ 6. Τύπος και εντόπιση των γενετικών βλαβών του γονιδίου *SERPING1*.

Πίνακας 7. Γενετικές βλάβες του γονιδίου *SERPING1* (HAEdb, <http://hae.enzim.hu.php>).

Μεταλλάξεις του <i>SERPING1</i> στο ΚΑΟ	Ποσοστό HAEdb
απώλειας νοήματος	34.2%
αλλαγές πλαισίου ανάγνωσης	24.4%
αλλαγές στη θέση ματίσματος	9.4%
άνευ σημασίας	7.1%
μικρές ελλείψεις ή ενθέσεις	6.8%
αλλαγές στον εκκινητή	1.1%
μεγάλες γονιδιακές ανακατανομές (οφείλονται σε ανασυνδυασμό μεταξύ περιοχών Alu σε ιντρόνια)	17%

Πιθανός παθογενετικός μηχανισμός ΚΑΟ από Ανεπάρκεια C1-Inh

Ο αδρανής Παράγοντας XII συνδέεται και ενεργοποιείται από «ξένες» μεμβράνες, θέτοντας έτσι σε λειτουργία τον καταρράκτη της **πήξης του αίματος**. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας XII μετατρέπει την προκαλλικρεΐνη σε καλλικρεΐνη. Η αντίδραση αυτή αναστέλλεται από τον C1-Inh. Η καλλικρεΐνη στη συνέχεια, συμμετέχει στην ενεργοποίηση του C1 και παράλληλα μετατρέπει το κινινογόνο σε βραδυκινίνη. Η εξέλιξη αυτών των αντιδράσεων επιβραδύνεται από τον C1-Inh.

Η ενεργοποίηση του C1 κινητοποιεί την ενεργοποίηση της **κλασικής οδού**, αποτέλεσμα της οποίας είναι, μεταξύ άλλων, η παραγωγή της C2-κινίνης και C3a αναφυλατοξίνης. Ο ενεργοποιημένος Παράγοντας XII συμβάλλει επίσης στην μετατροπή των προενεργοποιητών πλασμινογόνου σε ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, οι οποίοι μετατρέπουν το **πλασμινογόνο σε πλασμίνη**, μια ισχυρή πρωτεάση της σερίνης. Η πλασμίνη επιταχύνει την μετατροπή των

είναι αρκετή, ενώ ο προσδιορισμός των λειτουργικών επιπέδων της είναι απαραίτητος για το ΚΑΟ τύπων ΙΙ, ΙΙΙ. Επίσης συμβάλλει και η μέτρηση της συγκέντρωσης του C4 και C2 παράγοντα του συμπληρώματος, οι συγκεντρώσεις των οποίων παρουσιάζουν σημαντική ελάττωση στην διάρκεια των επεισοδίων, ενώ παραμένουν σταθερά κάτω των φυσιολογικών τιμών κατά τα μεσοδιαστήματα.

Η διάκριση του ΚΑΟ από το ΕΑΟ επιτυγχάνεται με τη μέτρηση του C1q που στο τελευταίο βρίσκεται σταθερά ελαττωμένο (<10% των φυσιολογικών τιμών) (πίνακας 9) (35-38).

Συνήθως υπάρχει καθυστέρηση κατά μέσο όρο 10 ετών μεταξύ της εμφάνισης της νόσου και της διάγνωσης του ΚΑΟ (11). Στο ιδιοπαθές αγγειοίδημα, οι συγκεντρώσεις τόσο του C4 όσο και του C1-Inh αυξάνονται, επειδή εκεί οι παράγοντες συμπεριφέρονται ως πρωτεΐνες οξείας φάσεως.

Πίνακας 9. Εργαστηριακή διάγνωση αγγειοιδήματος

	ΚΑΟ-τύπου Ι	ΚΑΟ-τύπου ΙΙ	ΚΑΟ-τύπου ΙΙΙ	ΕΑΟ
Αντιγονικά επίπεδα C1-INH	↓	Φ	Φ	↓
Λειτουργικά επίπεδα C1-INH	↓	↓	Φ	Φ ή ↓
C3	Φ	Φ	Φ	Φ
C4	↓	↓	Φ	↓
C1q	Φ	Φ	Φ	↓

Τα **κριτήρια της διάγνωσης** του αγγειοιδήματος από ανεπάρκεια του C1-Inh είναι τρία μείζονα κλινικά κριτήρια: 1. Αυτοπεριορισμένο, μη φλεγμονώδες, υποδόριο αγγειοίδημα χωρίς κνιδωτικό εξάνθημα, συχνά υποτροπιάζων διάρκειας πάνω από 12 ώρες, 2. Αυτοπεριορισμένος κοιλιακός πόνος χωρίς εμφανή οργανική αιτία, συχνά υποτροπιάζων και με διάρκεια πάνω από 6 ώρες, 3. Υποτροπιάζον λαρυγγικό οίδημα και ένα έλασσον κλινικό κριτήριο που είναι η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού με αγγειοίδημα ή κοιλιακό πόνο ή λαρυγγικό οίδημα.

Επίσης υπάρχουν τρία εργαστηριακά κριτήρια: 1. Αντιγονικά επίπεδα C1-Inh <50% του φυσιολογικού, σε δύο ξεχωριστές μετρήσεις, σε φυσιολογικές

συνθήκες μετά το πρώτο έτος της ζωής, 2. Λειτουργικά επίπεδα C1-Inh <50% του φυσιολογικού, σε δύο ξεχωριστές μετρήσεις, σε φυσιολογικές συνθήκες μετά το πρώτο έτος της ζωής, 3. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του C1-Inh, *SERPING1*, που τροποποιούν την σύνθεση και τη λειτουργία πρωτεϊνών. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται εάν έχουμε ένα μείζον κλινικό κριτήριο και ένα από τα εργαστηριακά κριτήρια (39).

Η **διαφορική διάγνωση** του αγγειοοιδήματος από άλλες νόσους επιτυγχάνεται με την βοήθεια των κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων. Η μείωση της συγκέντρωσης του παράγοντα C4 μπορεί να εμφανίζεται και στον συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (Σ.Ε.Λ), στο σύνδρομο δερματικής αγγειίτιδας με ελάτπωση συμπληρώματος (HUVS, Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome), στην κρουσφαιριναιμία και στα σύνδρομα απελευθέρωσης κυτοκινών (40,41). Σε αυτές τις περιπτώσεις επιβάλλεται ο έλεγχος της λειτουργικότητας του C1-Inh.

Αγγειοοίδημα χωρίς κνίδωση που δεν ανταποκρίνεται στα αντιισταμινικά φάρμακα είναι το χαρακτηριστικό του ΚΑΟ. Εκτός από τη διάκριση του ΚΑΟ από το ΕΑΟ, που όπως ήδη αναφέραμε, επιτυγχάνεται με τη μέτρηση του C1q που στο τελευταίο βρίσκεται σταθερά ελαττωμένο, η διάκριση από το ΚΑΟ εξαρτώμενο από τον παράγοντα XIII, το επαγόμενο από αναστολείς της ACE αγγειοοίδημα και το ιδιοπαθές μιμούνται το αγγειοοίδημα από ανεπάρκεια του C1-Inh. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα οίδημα αφορούν κυρίως το πρόσωπο και το λάρυγγα ενώ δεν παρατηρείται διαταραχή των παραγόντων του συμπληρώματος και του C1-Inh (42,43).

Άλλες πιο σπάνιες παθήσεις που πρέπει να διακρίνουμε από το ΚΑΟ, είναι η άμεση απελευθέρωση ισταμίνης από φάρμακα (μορφίνη, κωδεΐνη, ακτινοσκοπικά φάρμακα), η υπερευαισθησία στην ασπιρίνη και στα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, το αγγειοοίδημα από δόνηση ή ψύχος, το, η δερματική/ συστηματική ιστοκυττάρωση, η ανεπάρκεια παράγοντα I, το αγγειοοίδημα του προσώπου με ηωσινοφιλία, η ανεπάρκεια της καρβοξυπεπτιδάση N και το ψευδοαλλεργικό σύνδρομο (σύνδρομο Munchausen) (9).

1.Γ. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Στο ΚΑΟ, από την στιγμή που θα τεθεί η διάγνωση, η θεραπεία περιλαμβάνει τρεις κατευθύνσεις: α) την μακροχρόνια προφύλαξη, β) την βραχύχρονη προφύλαξη, γ) την αντιμετώπιση των επεισοδίων.

Η **μακρόχρονη προφύλαξη** (long term treatment) αποσκοπεί στην πρόληψη των επεισοδίων οιδήματος και προτείνεται συνήθως σε ασθενείς με συχνά και σοβαρά επεισόδια (περισσότερα του ενός το μήνα) (44,45). Για τη θεραπεία αυτή χρησιμοποιούνται δύο είδη φαρμάκων οι αντιϊνωδολυτικοί παράγοντες και τα παράγωγα ανδρογόνων. Οι αντιϊνωδολυτικοί παράγοντες (όπως το τρανεξαμικό οξύ που χρησιμοποιούνταν παλαιότερα) φαίνεται ότι δρουν μέσω της ελάττωσης της παραγωγής της πλασμίνης, την οποία προκαλούν (46-49). Χρησιμοποιούνται για παιδιά γιατί η χρήση ανδρογόνων επιδρά στην ανάπτυξη.

Από τα παράγωγα της τεστοστερόνης, μόνο τα 17 α-αλκυλιωμένα ανδρογόνα έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στο ΚΑΟ. Η δαναζόλη, οξανδρολόνη, τιμπολόνη και η σταναζόλη είναι τα περισσότερο χορηγούμενα παράγωγα ανδρογόνων (50,51). Σήμερα προτείνεται από την διεθνή επιστημονική κοινότητα χαμηλές δόσεις ανδρογόνων, ώστε να αποφευχθούν οι παρενέργειες. Επιβάλλεται τακτικός έλεγχος της ηπατικής λειτουργίας, υπερηχογραφικός έλεγχος ήπατος και έλεγχος της αρτηριακής πίεσης για όσους ασθενείς λαμβάνουν για μεγάλο διάστημα προφύλαξη (52,53).

Μακροχρόνια θεραπεία υποκατάστασης με C1-Inh έχει επιτυχία σε ασθενείς με συχνά επεισόδια (περισσότερα από δύο το μήνα) και μικρή ηλικία έναρξης της νόσου. Σκοπός της θεραπείας είναι η μείωση της σοβαρότητας και της διάρκειας των επεισοδίων. Αυτή η θεραπεία δεν καταργεί τα επεισόδια σε κάθε ασθενή και ούτε είναι το ίδιο αποτελεσματική μεταξύ των ασθενών (54,55). Το βασικό πλεονέκτημα είναι ότι αποτελεί εναλλακτική λύση για εγκύους και παιδιά που χρειάζονται προφύλαξη.

Η **βραχύχρονη προφύλαξη** θεωρείται απαραίτητη σε επεμβάσεις γενικής χειρουργικής και οδοντιατρικές επεμβάσεις. Το οίδημα έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να συμβεί στην περιοχή του τραύματος επομένως στις οδοντιατρικές επεμβάσεις στο πρόσωπο και το λάρυγγα, συνήθως μετά από 4-48 ώρες (56). Χορηγούνται είτε διπλάσιες ημερήσιες δόσεις ανδρογόνων πέντε μέρες πριν και δύο μετά, είτε C1-Inh πριν την επέμβαση. Καταψυγμένο πλάσμα που περιέχει C1-Inh σε 2-3 μονάδες, μπορεί να χορηγηθεί επί ελλείψεως C1-Inh (57).

Για την **αντιμετώπιση των επεισοδίων** τα τελευταία χρόνια έχουμε πολλές επιλογές, όπως υποκατάσταση του C1-Inh με προϊόντα πλάσματος, αναστολείς υποδοχέα βραδυκινίνης και ανταγωνιστές καλλικρεΐνης, και ανασυνδιασμένο C1-Inh. Όλες οι θεραπείες είναι αποτελεσματικές για όλα τα οίδημα, ενώ η απάντηση είναι πιο γρήγορη όσο συντομότερα ξεκινήσει η θεραπεία (18,54,55,58-66).

Θεραπεία εκλογής είναι η ενδοφλέβια χορήγηση συμπυκνωμένου C1-Inh (plasma-derived C1-Inh), όπως έχει επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες (54,60,64,65). Η θεραπεία είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και άμεση ακόμα σε σοβαρά επεισόδια με οίδημα λάρυγγα. Έχει συγκριθεί και με τη χρήση ενός παραγώγου γάλακτος, από ανασυνδυασμένα κουνέλια την πρωτεΐνη Racunest. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ίδια σε διαμόρφωση με τον C1-Inh αλλά έχει διαφορετική γλυκοζυλίωση. Αυτό δείχνει να μην επηρεάζει την δραστηριότητα του φαρμάκου αλλά έχει μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής σε σχέση με τον C1-Inh (62, 67).

Το Icatibant acetate, ένα υποδόριο συνθετικό πεπτίδιο αναστολέας του B2BKR, έχει διαπιστωθεί ότι είναι αποτελεσματικό, κυρίως για κρίσεις περιφερικού οίδηματος και λιγότερο για τον κοιλιακό πόνο. Οι πιθανές παρενέργειες των ασθενών μπορεί να είναι τοπικό ερύθημα και πόνο στο σημείο ενέσεως του φαρμάκου, ενώ 10% παρουσίασαν υποτροπιάζων οίδημα μετά από 16- 24 ώρες. Η δεύτερη ένεση με το φάρμακο είναι συνήθως πιο αποτελεσματική (49,58,60).

Η Ecallantide, μία μικρή ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη ανταγωνιστής της καλλικρεΐνης, που συντίθεται στο *Pichia Pastoris*, έχει εγκριθεί για χρήση ως θεραπευτικό των κρίσεων ΚΑΟ. Η χρήση του ακόμα έχει αμφιλεγόμενα αποτελέσματα σε σχέση με τις παρενέργειες (68-70).

Στο **ΕΑΟ** η αντιμετώπιση δεν διαφέρει από αυτήν του ΚΑΟ, όμως η ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία δεν είναι ικανοποιητική, για το λόγο αυτό πρέπει να αντιμετωπίζεται πρώτα η βασική νόσος .

2. ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΟ ΑΓΓΕΙΟΤΑΣΙΝΗΣ (ACE)

Το **μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτασίνης (ACE, angiotensin converting enzyme)** είναι μια μεταλλοπεπτιδάση που διανέμεται στα ενδοθηλιακά και

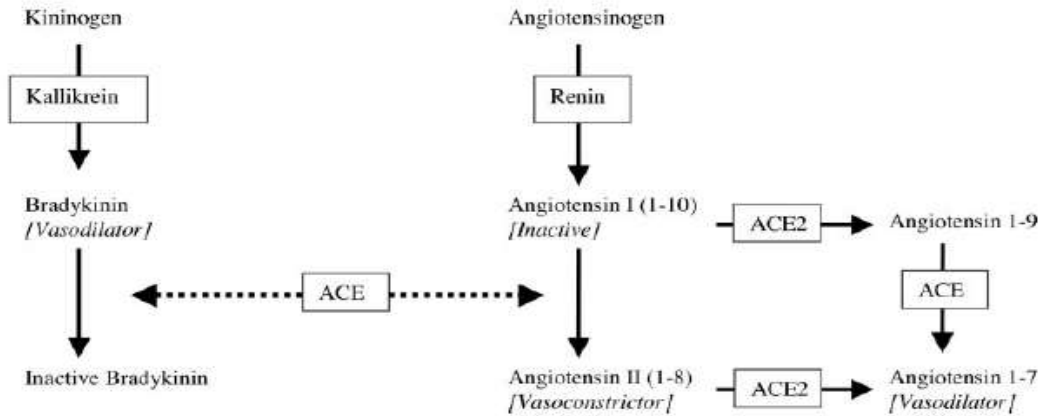
επιθηλιακά κύτταρα. Η ACE μετατρέπει το ανενεργό δεκαπεπτιδίο, αγγειοτασίνη I, σε ενεργό οκταπεπτιδίο και ισχυρό αγγειοσυσταλτικό, την αγγειοτασίνη II μέσω του συστήματος Ρενίνης-Αγγειοτασίνης (RAS, Renin-angiotensin system), ενώ συμμετέχει και στον καταβολισμό της βραδυκινίνης μέσω του συστήματος Κινίνης-Καλλικρεΐνης (KKS, Kinine Kallikrein system) (εικόνα 10) (71).

Η αγγειοτασίνη II (Ang II) είναι το βασικό ενεργό προϊόν του συστήματος Ρενίνης-Αγγειοτασίνης (RAS, Renin-angiotensin system) (72). Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης ρυθμίζει μακροπρόθεσμα την πίεση του αίματος και τον όγκο αίματος. Το σχήμα 1 δείχνει την σχέση των πρωτεϊνών σε αυτό το ορμονικό σύστημα. Η ρενίνη απελευθερώνεται από τα κύτταρα του σπειράματος στα νεφρά κάτω από συνθήκες άλατος, μείωσης όγκου υγρών και ενεργοποίησης του συμπαθητικού συστήματος. Αυτή η πρωτεΐνη μετατρέπει το ανενεργό πεπτιδίο του κινινογόνου σε ενεργό, ώστε να παράγει την αγγειοτασίνη I (Ang I). Στην συνέχεια αυτή μετατρέπεται σε αγγειοτασίνη II, από την δράση του μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτασίνης (ACE). Η αγγειοτασίνη II είναι μία ισχυρή αγγειοσυσταλτική ουσία, ενώ δρα και στο νεφρικό φλοιό όπου προκαλεί την απελευθέρωση της αλδοστερόνης, μία ορμόνη που διεγείρει τα σωληνοειδή των νεφρών, επιτρέποντάς τα να αναρροφούν περισσότερο νάτριο και νερό από τα ούρα (73). Αυτό επιδρά απευθείας στην αύξηση των υγρών στο αίμα, αποκαθιστώντας την μείωση όγκου και αυξάνοντας την πίεση του αίματος. Η αγγειοτασίνη II επίσης μεσολαβεί στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση διεγείροντας μια σειρά κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων (74). Επιπλέον επηρεάζει την λειτουργικότητα του ενδοθηλίου μειώνοντας την βιοδιαθεσιμότητα του νιτρικού οξέος (75). Αυτά τα ευρήματα αιτιολογούν την σημαντικότητα της αγγειοτασίνης II στην παθοφυσιολογία του καρδιοαγγειακού συστήματος και την αθηροσκλήρωση.

Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (ACE) επίσης παίζει σημαντικό ρόλο, όπως αναφέραμε, στο ορμονικό σύστημα της Κινίνης-Καλλικρεΐνης (εικόνα 10 και 11). Η ACE καταβολίζει την βραδυκινίνη, η οποία είναι μία ισχυρή αγγειοδιασταλτική ουσία, που διαμορφώνει τον ανενεργό μεταβολίτη βραδυκινίνη 1-5. Στο σχήμα 2 εκτός της ACE βλέπουμε και τα υπόλοιπα ένζυμα που συμμετέχουν στον καταβολισμό της βραδυκινίνης, όπως η αμινοπεπτιδάση P (APP, aminopeptidase P), η καρβοξυπεπτιδάση N (CPN, carboxypeptidase N) και η νευροπεπτιδάση (NEP, neuropeptidase P). Η ACE επίσης παίζει κυρίαρχο ρόλο στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης μέσω αυτού του μονοπατιού.

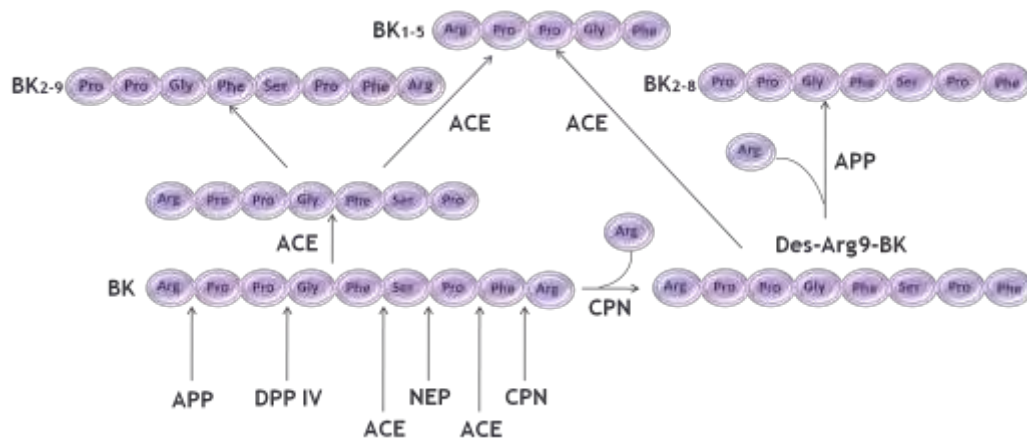
Kinin Kallikrein System

Renin Angiotensin System



ΕΙΚΟΝΑ 10. Το σύστημα της Κινίνης- Καλλικρεΐνης και Ρενίνης- Αγγειοτασίνης, (RAS, Renin-angiotensin system, KKS, Kallikrein-kininogen system)

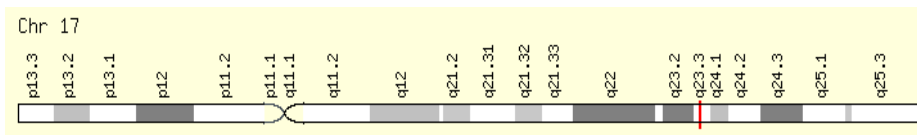
Οι νευροκινίνες είναι οικογένεια νευροδιαβιβαστών του κεντρικού νευρικού συστήματος που μετέχουν στην διαβίβαση του αισθήματος του πόνου, την ρύθμιση συναισθημάτων και την αλλαγή φλεγμονωδών και ανοσιακών απαντήσεων (76,77). Παρόλο που ο ρόλος της ACE στην εκφύλιση αυτών των πρωτεϊνών δεν μπορούσε πάντα να αντιγραφεί *in vivo*, πυροδότησε μία σειρά μελετών για την επίδραση της ACE σε νευρολογικά νοσήματα όπως η νόσος του Parkinson (78), η κατάθλιψη (79-81) και άλλες διαταραχές. Εκτός από αυτή την δράση, η ACE φαίνεται ότι καταβολίζει το πεπτιδίο αμυλοειδές β (82), ένα από του πρωταρχικούς βιολογικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου Alzheimer (AD) (83,84). Η παρουσία της σε επαρκή ποσότητα *in vivo*, μπορεί να εμποδίσει ή να μετριάσει τον σχηματισμό των γεροντικών πλακών, χαρακτηριστικό της νόσου.



ΕΙΚΟΝΑ 11. Σύστημα Κινίνης-Καλλικρεΐνης, (KKS, Kallikrein-kininogen system). Η δράση της ACE στον καταβολισμό της βραδυκινίνης προς σχηματισμό του μεταβολίτη βραδυκινίνη 1-5. Φαίνεται και η δράση των ενζύμων αμινοπεπτιδάση P (APP) και καρβοξυπεπτιδάση N (CPN).

3. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ACE ΚΑΙ ΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ

Παρόλο που η ACE φαίνεται να είναι ένα ένζυμο θηλαστικών, κοντινές ομόλογες αλληλουχίες με παρόμοια δραστηριότητα βρέθηκαν σε μία μεγάλη σειρά ζωικών ειδών. Στον *Homo sapiens*, το γονίδιο της ACE εδράζεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17q23) (εικ.1.2.α.). Το γονίδιο έχει μήκος 21 κιλοβάσεις (kb) και αποτελείται από 26 εξόνια και 25 ιντρόνια. Στο National Center for Biotechnology Information (NCBI) καταγράφηκαν παραπάνω από 160 πολυμορφισμοί του γονιδίου της ACE οι περισσότεροι από αυτούς είναι μονονουκλεοτιδικοί (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Μόνο 34 από αυτούς εδράζονται σε κωδικοποιούμενες περιοχές, οι υπόλοιπες είναι μεταλλάξεις απώλειας νοήματος.



ΕΙΚΟΝΑ 12. Η ακριβής θέση του γονιδίου του ACE στο χρωμόσωμα 17.

Το γονίδιο κωδικοποιεί δυο ισotypους της ACE, το σωματικό τύπο (somatic, sACE), με μοριακή μάζα 170 kDa, η οποία εκφράζεται στους σωματικούς ιστούς, και τον σπερματικό τύπο (germinal, gACE), με μικρότερη μοριακή μάζα που εκφράζεται στα σπερματικά κύτταρα των όρχεων (85). Αυτοί οι δυο τύποι προέρχονται από εισαγωγή δύο διαφορετικών εκκινητών. Η sACE μεταγράφεται από έναν εκκινητή που βρίσκεται στην 5' περιοχή του πρώτου εξονίου (Spro) και οδηγεί στην μεταγραφή όλων των εξονίων. Στο ώριμο mRNA της sACE τα εξόνια 1 έως 26 μεταγράφονται όλα εκτός από το 13 που αποκόπτεται κατά το μάτισμα. Η gACE μεταγράφεται από ειδικό εσωτερικό εκκινητή, ένα θραύσμα 91 βάσεων στο ιντρόνιο 12 (Gpro). Το ώριμο mRNA της gACE περιλαμβάνει τα εξόνια 13 έως 26. Οι δύο μορφές διαφέρουν στο ότι η sACE έχει και τα δύο τελικά άκρα ενεργά (N αμινοτελικό και C καρβοξυλικό άκρο), ενώ η gACE έχει μόνο το ένα άκρο ενεργό ανάλογο με το C καρβοξυλικό άκρο της sACE (75). Η ακριβής δράση της gACE παραμένει άγνωστη αλλά φαίνεται να παίζει ρόλο στην αναπαραγωγή (86).

Η δομή του γονιδίου του ACE μπορεί να προέρχεται από αναπαραγωγή σε πανομοιότυπο, αναδιπλασιασμό ενός προγονικού γονιδίου. Τα εξόνια 4 έως 11 και 17 έως 24, κωδικοποιούν τις 2 ομόλογες περιοχές του μορίου της ACE που είναι

παρόμοιες σε μέγεθος και αλληλουχίες (87). Σε όλα τα θηλαστικά είδη στα οποία έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο (άνθρωποι, ποντικοί, κουνέλια), φαίνεται ότι έχει αναδιπλασιαστεί. Στην Δροσόφιλα (*Drosophila melanogaster*), όμως, φαίνεται ότι δεν έχει αναδιπλασιαστεί, οπότε μπορεί το γονίδιο αυτό να είναι η προγονική του μορφή (88). Η υπόθεση αυτή προτείνει ότι έχει γίνει αναδιπλασιασμός 300 εκατομμύρια πριν.

Ένα ομόλογο της ACE, η 2ACE, έχει επίσης ανακαλυφθεί στο άνθρωπο. Η ανάλυση αλληλουχιών γονιδιώματος κλώνων cDNA βιβλιοθηκών, από ανθρώπους με λέμφωμα και καρδιακή ανακοπή (89,90), αποκάλυψαν ότι το γονίδιο της 2ACE αποτελείται από 18 εξόνια και εδράζεται στο Χρ22. Η ανακάλυψη του ενζύμου αυτού αύξησε τις γνώσεις για τις βιολογικές δράσεις και την παθοφυσιολογική σημαντικότητα και των άλλων πεπτιδίων αγγειοτενσίνης, εκτός της αγγειοτενσίνης II (Ang II) (σχήμα 1). Η αναφερόμενη αγγειοδιασταλτική δράση της αγγειοτενσίνης 1-7 (91) σε σχέση με την πιθανή εμπλοκή της 2ACE και στον καταβολισμό της Ang II και στην παραγωγή της Ang 1-7, αυξάνει την πολυπλοκότητα του συστήματος Ρενίνης- Αγγειοτενσίνης (22,23). Σε *in nitro* μελέτες καταδεικνύεται ότι η καταλυτική ικανότητα της 2ACE στην Ang II είναι 400 φορές μεγαλύτερη από αυτή στην Ang I, γεγονός που δείχνει ότι ο βασικός ρόλος της 2ACE είναι η μετατροπή της Ang II σε Ang 1-7. Οι δυνατότητες της Ang 1-7 σαν καρδιοπροστατευτικό πεπτίδιο με αγγειοδιασταλτική, αντιαυξητική και αντιπολλαπλασιαστική δράση ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα (91-95). Η 2ACE όμως είναι μία λιγότερο ενδιαφέρουσα πρωτεΐνη από την ACE, γιατί είναι περιορισμένα διαδεδομένη στους οργανισμούς. Στον άνθρωπο μεταγράφεται μόνο στους νεφρούς, στην καρδιά και τους όρχεις (89,90). Για το λόγο αυτό η μελέτη μας επικεντρώνεται στην ACE, τους λειτουργικούς πολυμορφισμούς της και πώς αυτοί σχετίζονται με διάφορα νοσήματα.

Στο πλάσμα τα επίπεδα του ACE είναι σταθερά, όταν μετρώνται επαναλαμβανόμενα στον ίδιο οργανισμό, ενώ παρουσιάζουν διαφορές από άτομο σε άτομο (96). Αυτό υποδεικνύει ότι πιθανό να υπάρχει αυστηρός μακροπρόθεσμος έλεγχος της έκκρισης με γενετική προέλευση. Το 1988, ο Cambien et al., σε έρευνα 87 υγείων οικογενειών βρήκαν ότι ένα μεγάλο γονίδιο ευθύνεται για την ποικιλία των επιπέδων της ACE μεταξύ των ίδιων ηλικιακά μελών, δηλαδή συγκρίθηκαν οι πατεράδες, οι μητέρες και τα παιδιά των διαφόρων οικογενειών (97). Το 1990, ο Rigat et al (98), δημοσίευσαν μία σημαντική αναφορά, που δίνει ώθηση για περαιτέρω έρευνα των πολυμορφισμών του γονιδίου αυτού. Ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν τον πολυμορφισμό που περιλαμβάνει την εισαγωγή (insertion, I) ή την έλλειψη (deletion, D) μίας

πολλαπλής Alu αλληλουχίας 287-bp στο ιντρόνιο 16 αυτού του γονιδίου (NCBI ref. SNP ID: rs1799752). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης ACE στα άτομα με γονότυπο DD ήταν περίπου διπλάσια των επιπέδων των ατόμων με γονότυπο II. Τα άτομα με γονότυπο ID, παρουσίαζαν ενδιάμεσα επίπεδα λόγω συνεπικράτησης.

Μεταγενέστερες μελέτες, έδειξαν ότι η συμμετοχή του I/D πολυμορφισμού δεν περιορίζεται στα επίπεδα της ACE μόνο στο πλάσμα αλλά και της ACE των ιστών (99,100). Αργότερα διαπιστώθηκε ότι το D αλληλίο σχετίζεται και με μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου της ACE συγκρινόμενο με το I αλληλίο π.χ. η βραδυκινίνη καταβολίζεται περισσότερο (D αλληλίο) ή λιγότερο (I αλληλίο) (101-103).

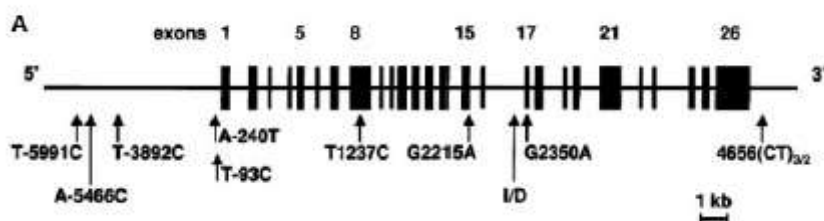
Ο I/D πολυμορφισμός της ACE αρχικά ανιχνεύτηκε με την τεχνική ανάλυσης πολυμορφισμών κατά μήκος των περιοριστικών τμημάτων των γονιδίων (RFLP, restriction fragment length polymorphism). Η πρώτη αντίδραση πολυμεράσης για την ανίχνευση αυτού του πολυμορφισμού αναφέρθηκε από τον Rigat (104) που χρησιμοποίησε ζεύγος εκκινητών που συνόρευαν με την αλληλουχία εισαγωγής. Μελέτες όμως που ακολούθησαν από τον Shanmugan (105) έδειξαν ότι με αυτή την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης υπάρχει πιθανότητα λάθους, ειδικά για τον προσδιορισμό των ετεροζυγών. Μία επιπρόσθετη αντίδραση πολυμεράσης σχεδιάστηκε μετά για τον ακριβέστερο προσδιορισμό των DD γονοτύπων, που περιλάμβανε νέο ζεύγος εκκινητών ποιο ειδικό της εισαγωγής (105). Αυτός ο συνδυασμός των δύο αντιδράσεων πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε σε πολλές μελέτες.

Παρόλο που ο I/D πολυμορφισμός της ACE μελετήθηκε αρκετά σε σχέση με καρδιαγγειακές και άλλες συστηματικές διαταραχές, το γεγονός ότι εδράζεται σε μη κωδικοποιούμενη περιοχή προκάλεσε αμφιβολίες για τη δράση του. Επειδή η σημαντικότητα του πολυμορφισμού αυτού ανακαλύφθηκε μελετώντας τα επίπεδα της ACE στο πλάσμα, πολλοί ερευνητές ακολουθώντας την ίδια πορεία προσπάθησαν να συσχετίσουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης με άλλες παραλλαγές στο γονίδιο, ώστε να εντοπίσουν και άλλους λειτουργικούς πολυμορφισμούς. Το 1996, ο Villard (106) πρότεινε δύο θέσεις ποσοτικών γνωρισμάτων (QTLs, quantitative trait loci) που ελέγχουν τα επίπεδα της ACE. Ισχυρίστηκαν ότι η μία QTL ήταν σε κοντινή ανισορροπία σύνδεσης (LD, linkage disequilibrium) με τον I/D πολυμορφισμό, ενώ η άλλη πιθανό αναγνωρίστηκε στην 5' περιοχή του γονιδίου.

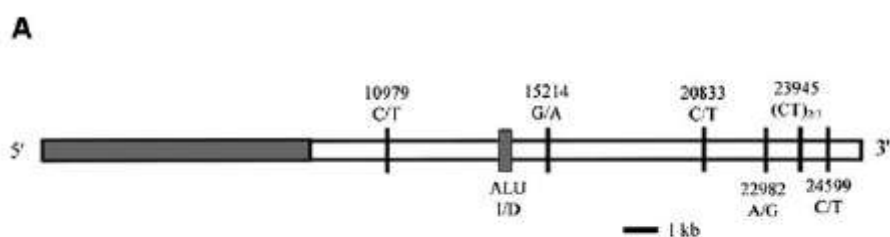
Ο Keavney et al. (107) ανέλυσαν τα επίπεδα της ACE πλάσματος και 10 πολυμορφισμούς (συμπεριλαμβανομένου και του διάσημου I/D πολυμορφισμού) μετρώντας 26 kb του γονιδίου σε Καυκάσιους Βρετανούς (εικόνα 13). Λόγω της

ισχυρής ανισορροπίας σύνδεσης αυτής της χρωμοσωμικής περιοχής, αποκάλυψαν έναν περιορισμένο αριθμό απλοτύπων (107), ενώ αυτοί οι απλότυποι έπρεπε να καθοριστούν και σε άλλους πληθυσμούς με διαφορετική εξελικτική ιστορία, για να γίνει έρευνα και για επιπρόσθετα προγονικά σημεία διακοπής του γονιδίου (breakpoints). Πολλές μελέτες υποστήριξαν την μεγάλη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ αφρικανικών πληθυσμών (108-110), το οποίο αυξάνει την πιθανότητα ανασυνδυασμένων απλοτύπων. Αξιολογώντας αυτή την ιδέα, ο Zhu et al. (111), εστίασαν στην 3' περιοχή το γονιδίου της ACE, χαρτογραφώντας 7 διαλληλικούς πολυμορφισμούς κατά μήκος περιοχής 16 κιλοβάσεων σε 159 Αφροκαριμπιανούς από την Τζαμάικα (εικόνα 14).

Η παρουσία και άλλων QTLs προτάθηκαν σε μεταγενέστερες μελέτες, που υποστήριξαν την λειτουργικότητα αυτών των θέσεων, αποδεικνύοντας ότι εάν αυτά τα QTLs αποτελούν ρυθμιστικά γονίδια, ίσως μπορούμε να εξηγήσουμε την συσχέτιση του γονιδίου της ACE, της ενεργότητας της ACE πρωτεΐνης και των κλινικών νοσημάτων που σχετίζονται με την ACE, έτσι ώστε να αναπτυχθούν εναλλακτικές μορφές θεραπείας και πρόληψης των νοσημάτων αυτών.



ΕΙΚΟΝΑ 13. Σχηματική ανάλυση του γονιδίου του ACE όπου φαίνονται οι 10 πολυμορφισμοί που αναλύθηκαν από τον Keavney et al.



ΕΙΚΟΝΑ 14. Σχηματική ανάλυση του γονιδίου του ACE στην περιοχή που εδράζονται οι 7 πολυμορφισμοί που μελέτησε ο Zhu et al..

4. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΤΟΥ ACE I/D ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Τα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι πολυμορφισμοί της ACE πρωτεΐνης, συμπεριλαμβανομένου και του I/D πολυμορφισμού, εμπλέκονται με παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς στα συστήματα Κινίνης- Καλλικρεΐνης και Ρενίνης -Αγγειοτασίνης, οδηγούν φυσικά σε συσχετίσεις με διάφορα νοσήματα. Έτσι μία σειρά μελετών δημοσιεύτηκαν, περίπου 1.450 έως σήμερα, που ερευνούν την σχέση του I/D πολυμορφισμού με ένα μεγάλο αριθμό κλινικών νόσων, όχι μόνο τον κίνδυνο εμφάνισης ή όχι της νόσου, αλλά την μελέτη των συμπτωμάτων, την αποτελεσματικότητα των θεραπειών και των φαρμάκων, την αλληλεπίδραση με γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, την εξέλιξη της κάθε νόσου και το προσδόκιμο επιβίωσης. Παρακάτω παρατίθενται τα πιο σημαντικά συμπεράσματα από κλινικά νοσήματα που μελετήθηκαν, με ένα όσο δυνατό περιεκτικό τρόπο.

4.A. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Πολλές μελέτες προσπάθησαν να αναλύσουν αν η ύπαρξη του D αλληλίου σχετίζεται με την **υπέρταση**. Έλλειψη συσχέτισεως έδειξαν επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα στις πρώτες προσπάθειες (112-118), ενώ αργότερα μεγάλος αριθμός μελετών ισχυρίστηκαν το αντίθετο (119-121). Η πρώτη μετανάλυση περιλάμβανε 23 μελέτες και υποστήριξε ότι υπάρχει συσχέτιση του D αλληλίου και υπέρτασης σε γυναίκες και σε Ασιάτες (122). Επόμενη μετανάλυση (123) σε Καυκάσιους, με μελέτες σχεδόν χωρίς επικάλυψη των προηγούμενων, υποστήριξε ότι δεν υπάρχει εξάρτηση της υπέρτασης από το D αλληλίο. Τελευταία μετανάλυση το 2005 (124) περιλάμβανε μία καινούργια λίστα μελετών, από τις οποίες οι 12 με θετική συσχέτιση και οι 14 με αρνητική. Όλα αυτά τα στοιχεία καταδεικνύουν ότι, αν υπάρχει επίδραση της παρουσίας του D αλληλίου στην υπέρταση αυτή είναι ελάχιστη, ενώ εξαρτάται και από επιδράσεις άλλων γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Ένας άλλος μεγάλος αριθμός μελετών δημοσιεύτηκαν για να ερευνηθούν την σχέση του πολυμορφισμού αυτού με την **αθηροσκλήρωση** χρησιμοποιώντας μετρήσεις του πάχους του ενδοθηλίου και μεσοθηλίου της καροτιδικής αρτηρίας (intima media thickness, IMT). Αναφέρουμε μεγάλη μετανάλυση το 2002 (125), (πίνακας 6) που υποστήριξε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση του D αλληλίου με την

αθηροσκλήρωση, και η συσχέτιση γίνεται πιο ισχυρή στα άτομα που έχουν και άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς καρδιαγγειακούς παράγοντας κινδύνου.

Πολλές μελέτες αναφέρονται στη σχέση του I/D πολυμορφισμού με το **έμφραγμα μυοκαρδίου** (myocardial infraction, MI), η πρώτη με θετική συσχέτιση του D αλληλίου έγινε το 1992 (126). Η πρώτη μετανάλυση δημοσιεύτηκε τρία χρόνια μετά με θετική συσχέτιση πάλι (123) (OR=1.21, [95% CI: 1.11,1.32]). Μελέτη του Keavney et al. (127), υποστήριξε ότι σε μικρότερες μελέτες τα θετικά αποτελέσματα είναι πιο εμφανή, παρόλο που οι μικρές μελέτες είναι πιο επιρρεπείς σε στατιστικά λάθη. Τελευταία μετανάλυση το 2007, όσο αφορά την **ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια** δεν έδειξε συσχέτιση του D αλληλίου με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Kitsios et al., 128). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι, σε σχέση με τις καρδιαγγειακές νόσους, το D αλληλίο δεν φαίνεται να είναι κλινικά σημαντικό στον γενικό πληθυσμό, αλλά ίσως παίζει σημαντικό ρόλο σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών που έχουν και άλλους παράγοντες κινδύνου.

Το **ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (Ι.Ε.Ε)**, όπως και το Ε.Μ, είναι αποτέλεσμα συνήθως θρόμβωσης που προκαλείται από τις αθηρωματικές πλάκες. Αυτή η ομοιότητα στην παθογένεση οδήγησε τους ερευνητές σε ένα αριθμό μελετών συσχέτισης πολυμορφισμών της ACE με το ισχαιμικό Ε.Ε. Παρόλο που δύο μετanalύσεις αναφέρουν σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του D αλληλίου και εγκεφαλικών επεισοδίων (129,130), υπήρχαν περισσότερα αρνητικά παρά θετικά αποτελέσματα σε μεταγενέστερες μελέτες. Οι αλληλεπιδράσεις του γονιδίου με περιβαλλοντικούς παράγοντες, περιπλέκουν τα αποτελέσματα των μελετών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι μελέτες συσχέτισης του I/D πολυμορφισμού με την θεραπεία των καρδιαγγειακών διαταραχών. Πρόσφατη μετανάλυση το 2009 (131), υποστηρίζει ότι η απάντηση στην θεραπεία της **στεφανιαίας νόσου**, (αγγειοπλαστική και αναστολείς της ACE), δεν σχετίζεται με την ύπαρξη του D αλληλίου, επομένως η ανάλυση του γονοτύπου του ασθενούς πριν την απόφαση του είδους της θεραπείας δεν είναι απαραίτητη.

4.B. ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΝΕΦΡΩΝ

Εξαιτίας του κεντρικού ρόλου της ACE στο σύστημα Ρενίνης- Αγγειοτασίνης μεγάλος αριθμός μελετών προσπάθησαν να ερευνήσουν την συσχέτιση του I/D

πολυμορφισμού με νεφρικές παθήσεις, όπως η **διαβητική νεφροπάθεια**. Οι περισσότεροι ερευνητές ισχυρίστηκαν ότι υπάρχει θετικό αποτέλεσμα, ενώ σε μελέτες ευαισθησίας που βασίστηκαν στην εθνικότητα, στην ηλικία, στην μέθοδο γονοτύπησης και στην εγκυρότητα του περιοδικού που δημοσιεύτηκαν, διαπιστώθηκε και πάλι ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των φορέων του D αλληλίου, όλων των υποομάδων, με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης διαβητικής νεφροπάθειας σε σχέση με τους ασθενείς με II γονότυπο. Ακολούθησαν δύο μεταanalύσεις που επιβεβαίωσαν το θετικό αποτέλεσμα σε σχέση με την διαβητική νεφροπάθεια, με την πιο πρόσφατη το 2010 [OR= 1.24 (95% CI 1.12–1.37)] (132,133).

Σε σχέση όμως με άλλα νοσήματα των νεφρών τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο αρμονικά. Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα μεταanalύσεις προσπάθησαν να ερευνήσουν εάν η ύπαρξη του D αλληλίου σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης της **IgA Νεφροπάθειας** (IgAN, IgA Nephropathy) (134), της **Διαβητικής Αμφιβληστροειδοπάθειας** επί εδάφους νεφροπάθειας (135), της **Σωματικής Πολυκυστικής Νόσου των Νεφρών** (ADPKD) (136), της **Εστιακής Τμηματικής Σπειραματοσκλήρυνσης** (FSGS, Focal Segmental Glomerulosclerosis) (137), του **Ανευρίσματος Κοιλιακής Αορτής** (138) και του **Ιδιοπαθούς Νεφρωσικού Συνδρόμου** (INΣ) στα παιδιά (133). Θετική συσχέτιση του D αλληλίου διαπιστώθηκε για την FSGS στην ομάδα των Ασιατών και όχι στους Καυκάσιους, Αφρικανούς και στο INΣ σε παιδιά στην Ασία.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μελέτες συσχέτισης του πολυμορφισμού I/D με την αποτελεσματικότητα των **θεραπειών με αναστολείς της ACE ή ανταγωνιστές του υποδοχέα της αγγειοτασίνης II**, όπου αξιολογώντας τα αποτελέσματα μπορούμε να διαπιστώσουμε ποιοι ασθενείς θα ανταποκριθούν καλύτερα στην θεραπεία των νεφρικών και καρδιαγγειακών νοσημάτων (Piero et al., Scharrpl et al., 139,140).

4.Γ. ΑΛΛΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

Λόγω της δράσης της ACE να καταβολίζει το πεπτιδίο αμυλοειδές β *in vitro* (82), υψηλότερα επίπεδα ACE πιθανό παίζουν προστατευτικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της **νόσου Alzheimer (AD)**. Ο *Kehoe et al*, υποστήριξε για πρώτη φορά, ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του I αλληλίου και της AD (OR=2.43 [95% CI: 1.35, 4.39]) (141). Όπως ήταν αναμενόμενο μία μεταγενέστερη μετανάλυση επιβεβαίωσε ότι η συσχέτιση είναι σημαντική και δεν μεταβάλλεται με την προσθήκη και άλλων μικρότερων μελετών (142). Γενικά

παρόλο που η συσχέτιση αυτή εδραιώθηκε καλά, γνωρίζοντας ότι ο I/D πολυμορφισμός δεν είναι ο βασικός λειτουργικός για την AD (143), η χαμηλή στατιστική δύναμη είναι ο κύριος λόγος που οι διάφορες μελέτες είναι ασυνεπής.

Στην διεθνή βιβλιογραφία καταγράφονται μία σειρά νοσημάτων που σχετίστηκαν άλλοτε αρνητικά και άλλοτε θετικά με τον I/D πολυμορφισμό της ACE, όπως είναι η **χρόνια κνίδωση συνοδευόμενη με επεισόδια αγγειοοιδήματος** (144), όπου η θετική συσχέτιση εμφανίζεται, επί παρουσίας I αλληλίου, μόνο σε ασθενείς με χρόνια κνίδωση που εκδήλωσαν και αγγειοοίδημα, συγκριτικά με αυτούς που είχαν χρόνια κνίδωση και υγιείς. Σημαντικές συσχετίσεις έγιναν με το **μεταβολικό σύνδρομο** και την **νοσογόνο παχυσαρκία** με βάση τον δείκτη μάζας σώματος και τη μάζα λίπους (BMI, fat mass), όπου τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά όσο αναφορά το μεταβολικό σύνδρομο αλλά δείχνουν κάποια σχέση του D αλληλίου με υψηλότερο BMI και fat mass (145). Άλλες συσχετίσεις είναι με την βρογχοπνευμονική νόσο των νεογνών (Bronchopulmonary dysplasia, BPD), με την αποφρακτική άπνοια ύπνου (Obstructive sleep apnea, OSA) και με την χρόνια παγκρεατίτιδα, καρκίνο παγκρέατος (145-148.). Τα νοσήματα αυτά είναι πολυπαραγοντικά, με επιδράσεις πολλών περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων, όπου η στατιστική ασφάλεια είναι μικρή και τα αποτελέσματα δεν είναι ακριβή, απαιτώντας περαιτέρω έρευνα.

Τέλος μελέτες υποστήριξαν την συσχέτιση του D αλληλίου με την **υπετροφία της δεξιάς κοιλίας (left ventricular hypertrophy, LVH)** και του I αλληλίου με την μυϊκή επίδοση (149-156). Παρόλο που στην διεθνή βιβλιογραφία λοιπόν υπάρχουν περίπου 2.670 μελέτες μέχρι σήμερα, που αφορούν τους πολυμορφισμούς της ACE (κυρίως τον I/D πολυμορφισμού) και υποδεικνύουν την εμπλοκή της σε πολλούς παθογενετικούς μηχανισμούς, η παρούσα μελέτη για το ΚΑΟ γίνεται για δεύτερη φορά επομένως τα συμπεράσματα αναμένεται να προκαλέσουν έναυσμα για περαιτέρω έρευνα.

5. ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ACEi ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ

Ξαφνικό υποδόριο ή υποβλεννογόνιο οίδημα, αγγειοοίδημα, που οφείλεται σε λήψη φαρμάκων, αναστολέων του ACE, ονομάζεται επαγόμενο από ACEi αγγειοοίδημα (**angiotensin converting enzyme inhibitor induced angioedema, AE-ACEi**) (157) και σύμφωνα με την ταξινόμηση αποτελεί μία μορφή επίκτητου αγγειοοιδήματος, που κάποιες φορές είναι απειλητικό για την

ζωή. Σύμφωνα με γερμανική μελέτη πάνω από 6,5 εκατομμύρια ασθενών λαμβάνουν αναστολείς της ACE αλλά υπολογίζεται ότι μόνο το 0,5% εμφανίζουν αγγειοίδημα ως επιπλοκή (158,159).

Η εκδήλωση αγγειοοιδήματος ως επιπλοκή της θεραπείας με αναστολείς του ACE μπορεί να παρουσιαστεί από την πρώτη μέρα ως 10 χρόνια θεραπείας. Το συχνό χρονικό διάστημα όμως είναι 35,8 μήνες \pm 5,3 μήνες θεραπείας (160). Η καθυστέρηση αυτή αποτελεί σημαντική αιτία για την μη αναγνώριση του αγγειοοιδήματος ως φαρμακευτική επιπλοκή και επιτάσσει τον προσδιορισμό πιθανών προγνωστικών δεικτών εκδήλωσης της νόσου.

Το επαγόμενο από ACEi αγγειοίδημα πιστεύεται ότι αποτελεί αποτέλεσμα αλλαγών του μεταβολικού μονοπατιού της βραδυκινίνης, ως ενδιάμεσο παράγοντα φλεγμονής και ως αγγειοδιασταλτικό (161-167). Γενικά αλλαγές των επιπέδων βραδυκινίνης στο πλάσμα και τους ιστούς μπορούν να οδηγήσουν σε ελάττωση δράσης ενζύμων καταβολισμού, όπως του ACE ή αύξηση ενζύμων παραγωγής όπως η καλλικρείνη. Μέχρι τώρα παραμένει αδιευκρίνιστο γιατί το αγγειοίδημα εμφανίζεται μόνο σε τόσους λίγους ασθενείς από αυτούς που λαμβάνουν θεραπεία με ACEi και γιατί μετά από τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα θεραπείας.

Οι αναστολείς της ACE, που χορηγούνται για την ρύθμιση καρδιαγγειακών διαταραχών, ευθύνονται για την μείωση της αγγειοτασίνης II και την αύξηση της βραδυκινίνης στο πλάσμα. Επί παρουσίας των ACEi, η *in vivo* αναστολή της αμινοπεπτιδάσης P (APP, aminopeptidase P) προκαλεί τις προφλεγμονώδεις επιδράσεις της βραδυκινίνης. Σε ασθενείς με ιστορικό αγγειοοιδήματος επαγόμενου από ACEi μελετήθηκε η δραστηριότητα στο πλάσμα της αμινοπεπτιδάσης P (APP) και της καρβοξυπεπτιδάσης N και βρέθηκε ότι παρουσιάζουν μειωμένη μέση ενεργότητα στο πλάσμα σε σχέση με ασθενείς που λάμβαναν ACEi και δεν εμφάνισαν αγγειοίδημα (167,168). Βασιζόμενοι σε αυτές τις μελέτες ο Duan et al, (169), διαπίστωσε συσχέτιση ($P < 0,0364$) ενός πολυμορφισμού (του C-2399A) στο γονίδιο XPNPEP2, που κωδικοποιεί την μεμβρανική αμινοπεπτιδάση P, με την μειωμένη ενεργότητα της αμινοπεπτιδάσης P και την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης AE-ACEi.

Πρόσφατη μελέτη (Bas et al., 157) έρχεται να ερευνήσει εάν ο I/D πολυμορφισμός της ACE αποτελεί πιθανό γενετικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης αγγειοοιδήματος επαγόμενου από ACEi (AE-ACEi). Στην ίδια μελέτη ερευνώνται και άλλοι πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με τον καταβολισμό της βραδυκινίνης, όπως δύο πολυμορφισμοί στο B2 υποδοχέα της βραδυκινίνης (B2BKR, bradykinine receptor B2). Ο ένας από αυτούς τους πολυμορφισμούς

εδράζεται στο εξόνιο 1 δίπλα στον εκκινητή και είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες -GGTGGGGAC-, ενώ ο άλλος είναι μία αντικατάσταση C – T (c.C181T), που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος αργινίνης από κυστεΐνη, στην πρωτεΐνη του υποδοχέα στην θέση 14 (p. R14C) και εδράζεται στο εξόνιο 2 (νουκλεοτιδική θέση 181) (170-172). Αποτέλεσμα της μελέτης έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας εμφάνισης του επαγόμενου από ACE1 αγγειοιδήματος και του I/D πολυμορφισμού του ACE ή των πολυμορφισμών του B2BKR (2/3; C181T). Παρόλα αυτά, βρέθηκε τάση των ασθενών με αγγειοίδημα και I/I γονότυπο να μειώνουν τη ενεργότητα του ACE του ορού.

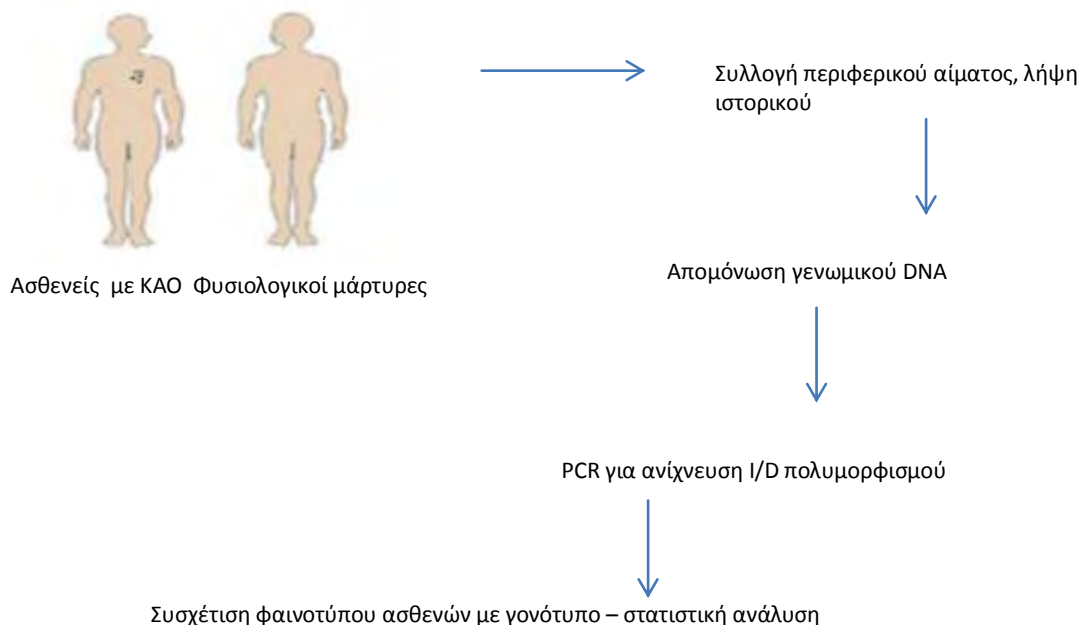
6. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση του I/D πολυμορφισμού του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ACE με τον φαινότυπο ασθενών με κληρονομικό αγγειοίδημα. Βάσει των στοιχείων που υπάρχουν στην βιβλιογραφία (175), η μελέτη αυτή αποτελεί την δεύτερη προσπάθεια συσχέτισης της ACE με τον φαινότυπο ασθενών με ΚΑΟ.

Η συσχέτιση διαφορετικών πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο καταβολισμό της βραδυκινίνης, όπως η ACE που η ύπαρξη του D αλληλίου αυξάνει τον καταβολισμό της βραδυκινίνης σε σχέση με το I αλληλίο (7,174), μπορεί να επιφέρει χρήσιμα συμπεράσματα για τον φαινότυπο των ασθενών με ΚΑΟ και την αντιμετώπιση της νόσου.

Για τον σκοπό αυτό ακολουθήσαμε μία διαδικασία, αρχικά, συλλογής δειγμάτων περιφερικού αίματος και πληροφοριών από το οικογενειακό και ατομικό ιστορικό ασθενών με ΚΑΟ και των οικογενειών τους, που προήλθαν από τη Ρουμανία και την Ελλάδα με συνολικό αριθμό 70.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος φυσιολογικών μαρτύρων. Μετά ακολούθησε διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού, γενωμικού DNA, και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) εντοπισμός του I/D πολυμορφισμού του γονιδίου της ACE. Ακολούθησε κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά τους και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για να προσδιοριστεί πιθανή συσχέτιση των γονοτύπων DD, I/D και II με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου (εικόνα 15.). Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων έγινε με διαγράμματα και πίνακες.



ΕΙΚΟΝΑ 15.: Σχηματική παρουσίαση του ερευνητικού πρωτοκόλλου

7. ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα έρευνα μελετήσαμε σε μοριακό επίπεδο 70 άτομα από 34 διαφορετικές οικογένειες με κληρονομικό αγγειοίδημα τύπου I και II από τους οποίους έχουμε πλήρεις κλινικές πληροφορίες και προέρχονται από δύο χώρες, Ελλάδα και Ρουμανία. Τα δείγματα ήταν στην διάθεση μας από συλλογή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Λάρισα). Η συλλογή του υλικού έγινε κατά το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου του 2009 με Μάιο του 2012 με την βοήθεια διαγνωστικών κέντρων και νοσοκομείων της Ελλάδας και της Ρουμανίας.

Δημογραφικά στοιχεία των ατόμων της ομάδας ελέγχου παρατίθενται στον Πίνακα 16 που συνοδεύει το κείμενο. Από τα 70 άτομα με ΚΑΟ, 19 άτομα ήταν από την Ρουμανία και 51 από την Ελλάδα, από 34 οικογένειες. Συγκεκριμένα όλα τα άτομα είχαν διαγνωστεί με ΚΑΟ παρουσιάζοντας τουλάχιστον ένα σημαντικό κλινικό κριτήριο και ένα εργαστηριακό κριτήριο, μαζί με θετικό οικογενειακό ιστορικό, σύμφωνα με τις τελευταίες κατευθυντήριες γραμμές για τη διάγνωση του κληρονομικού αγγειοιδήματος (39).

Ο διαχωρισμός έγινε με βάση το φύλο, 36 είναι άνδρες και οι 34 γυναίκες, την ηλικία τους (<14 ετών, πριν και μετά τα 30 έτη), με βάση την ηλικία έναρξης

της νόσου, με βάση την ηλικία διάγνωσης της νόσου, είναι τα 28 έτη για τους Έλληνες με μία μέση καθυστέρηση 18 ετών από την πρώτη εκδήλωση και τα 38 έτη για τους Ρουμάνους με μέση καθυστέρηση 10 έτη.

Ο υπόλοιπος διαχωρισμός των ασθενών έγινε με βάση τα επεισόδια κλινικών εκδηλώσεων, από το λάρυγγα και την κοιλιακή χώρα και την σοβαρότητά τους, καθώς και την λήψη ή όχι μακροχρόνιας προφύλαξης (31 ασθενείς), στηριζόμενοι στην βιβλιογραφία (Cumming et al., 173).

Πίνακας 16. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και φαινοτυπικοί παράμετροι που αξιολογήθηκαν.

	Συνολικά	Ρουμανία	Ελλάδα
Αριθμός (οικογενειών, ασθενών)	34,70	14,19	20,51
Φύλο (άνδρες/ γυναίκες)	36/34	7/12	29,22
Ηλικία ανάλυσης (μέση τιμή, εύρος)	38.6, 5-80	38.8, 10-72	38.5, 2-80
Ηλικία έναρξης (μέση τιμή, εύρος)	15.8, 2-70	27.4, 2-70	11.4, 2-32
Ηλικία διάγνωσης (μέση τιμή, εύρος)	30.9, 2-78	37.0, 10-70	28.7, 2-78
Καθυστέρηση διάγνωσης (μέση τιμή, εύρος)	15.7, 0-58	9.7, 0-52	18.5, 0-58
Άτομα χωρίς συμπτώματα (ν, %)	5, 7.1	1, 5.3	4, 7.8
Ηλικία (μέση τιμή, εύρος)	14.2, 2-45	45	6, 2-16
Χωρίς οικογενειακό ιστορικό (ν, %)	7, 10.0	1, 7.1	6, 30
ΚΑΟ τύπου II (ν,%)	3, 8.8	1, 7.1	2, 10
Ασθενείς με κρίσεις λάρυγγα (ν, %)	39, 55.7	12, 63.2	27, 52.9
Ασθενείς με κρίσεις κοιλιακής χώρα (σπάνια, συχνά, κυρίως, ν, %)	16 (22.9), 29(41.4), 25 (35.7)	1 (5.3), 12 (63.2), 6(31.6)	15 (29.4), 17 (33.3), 19 (37.3)
Ασθενείς σε μακροχρόνια προφύλαξη (ν, %)	31, 44.3	3, 15.8	28, 54.9

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 103 υγιή άτομα, ως φυσιολογικοί μάρτυρες, από την βάση δειγμάτων του εργαστηρίου Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας, για την

σύγκριση των αποτελεσμάτων. Από αυτούς ήταν 54 άνδρες και 49 γυναίκες, μέση ηλικία 65.3 έτη, ηλικιακό εύρος 10 έως 90 ετών και η ομάδα αυτή χρησίμευσε ως υγιής ομάδα μαρτύρων για την εκτίμηση του επιπολασμού του εξεταζόμενου πολυμορφισμού στο γενικό ελληνικό πληθυσμό.

Πίνακας 18. Δημογραφικά στοιχεία ομάδας φυσιολογικών μαρτύρων.

Φυσιολογικοί μάρτυρες	Συνολικά
Αριθμός	103
Φύλο (άνδρες/ γυναίκες)	54/ 49
Ηλικία (μέση τιμή/ εύρος)	65.3/ 10-90
Καταγωγή	Ελληνική

Όλα τα δείγματα προήλθαν από ανεξάρτητα άτομα, Ελληνικής και Ρουμανικής καταγωγής, όπως αξιολογούνται από το ερωτηματολόγιο. Η έρευνα διεξήχθη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι, που συντάχθηκε από την Παγκόσμια Ιατρική Ένωση (WMA) και εγκρίθηκε από τα Επιστημονικά Συμβούλια των συμμετεχόντων νοσοκομείων. Γραπτή συγκατάθεση δόθηκε από κάθε άτομο ή το συνοδευόντα συγγενή, στην περίπτωση των ασθενών από τους οποίους η συναίνεση δεν ισχύει νομικά (π.χ. παιδιά).

8. ΜΕΘΟΔΟΙ

8.A. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμο kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Cat 51104). Αναλυτικά, σε δείγμα περιφερικού αίματος προστίθεται ειδική πρωτεάση που παρέχεται στο kit και έτσι εμποδίζεται η επιμόλυνση και πιθανή πέψη του DNA από πρωτεΐνες (ως DNAses). Με την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (AL), ακολουθεί επώαση στους 56°C για 20min-2h, και τα κύτταρα λύνονται. Ακολούθως το υλικό τοποθετείται στις ειδικές στήλες και το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη

αιθανόλης (96-100%). Ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις καθαρισμού με τη χρήση ειδικών ρυθμιστικών διαλυμάτων του kit (AW1, στις 6000 στροφές, για 1' και AW2 στις 14000 στροφές για 3'). Τελικά με την προσθήκη του Buffer AE και φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 1' απομονώνεται ολικό DNA περίπου 6μg από 200μl περιφερικού αίματος. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, σε όλα τα δείγματα το DNA προσδιορίστηκε με τη χρήση του φωτομέτρου Bio Photometer (Erppendorf), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

8.B. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Ακολουθεί μία αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης η οποία είναι ειδική για τη διάκριση των αλληλίων I και D στο γονιδίωμα. Συγκεκριμένα, η υπό μελέτη αλληλουχία DNA ενισχύεται με PCR με ένα ζεύγος εκκινητών. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία, προέρχεται από τη μελέτη των Turet et al και είναι στον πίνακα 19 (MWG Biotech, Eberberg, Germany) και παράγουν προϊόντα 490 bp και 190bp που αντιστοιχούν στο I και D αλληλίο αντίστοιχα.

Πίνακας 19 Στοιχεία ζεύγους εκκινητών, πρόσθιος (F) και οπίσθιος(R).

Αλληλουχία	Μέγεθος
F: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	24 bp
R: 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	25 bp
Προϊόντα	490 bp και 190bp I και D αλληλίο αντίστοιχα

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες: αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 3', 33 κύκλοι (αποδιάταξη στους 94 °C για 30", αναδιάταξη στους 59 °C για 30", επιμήκυνση στους 72 °C για 45") και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5'. Κατασκευάστηκε ένα κύριο μείγμα και ένα μείγμα Taq πολυμεράσης με τα εξής συστατικά:

Πίνακας 20 Υλικά κύριου μείγματος.

Αντιδραστήριο	Όγκος
H ₂ O	235 μl
10x PCR Buffer	50 μl
dNTPs	40 μl
MgCl ₂	15 μl
Primer F	10 μl [50 pmol/ μl]
Primer R	10 μl [50 pmol/ μl]

Πίνακας 21. Υλικά μείγματος Taq πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος
H ₂ O	50 μl
Taq	2,2 μl

Για κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε ένα φιαλίδιο 22 μl από το κύριο μείγμα, 6 μl από το μείγμα Taq πολυμεράσης και 2 μl DNA του δείγματος, ενώ χρησιμοποιήθηκε ένα τυφλό δείγμα για κάθε αντίδραση. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε σωληνάρια της Corning (Corning Cat 6571) και σε θερμοκυκλοποιητές Robo-cycler Gradient 96 Stratagene.

8.Γ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης PCR, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης (Invitrogen, Cat No 15510-027) 3% σε διάλυμα TBE (BioRad, Cat No 161-0770). Κατά την ηλεκτροφόρηση, αναλύεται πάντα πλασμιδιακό DNA με προϊόντα γνωστού μεγέθους, για την κατάδειξη της παρουσίας των αναμενομένων προϊόντων των αντιδράσεων MSP (E-Gel low-range quantitative DNA ladder, Invitrogen, Cat No 12373-031). Για την ανάλυση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide: Biorad, Cat No 15585-011), το οποίο δεσμεύοντας το DNA εκπέμπει χημειοφωταύγεια, η οποία γίνεται αντιληπτή με χρήση υπεριώδους φωτός (UV).

Η φωτογράφιση των γελών (πηκτωμάτων) αгарόζης έγινε με χρήση της φωτογραφικής μηχανής της εταιρείας UNITEC, και του συνοδού λογισμικού gel capture (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap.



ΕΙΚΟΝΑ 22. Ηλεκτροφορητική κινητικότητα του D και I αλληλίου του ACE στα άτομα με ΚΑΟ. Φωτογραφία πηκτώματος αгарόζης, στις θέσεις 2- 13: οροί ασθενών με ΚΑΟ τύπου I, στην θέση 1: ορός φυσιολογικού ατόμου, (14 κενό). Διακρίνουμε το I αλληλίο στις 490bp και D αλληλίο στις 190bp.

8.Δ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε Pearson correlation, chi square test με Yates correction and Fisher's exact test, Mann-Wittney U-test, και Kruskal-Whallis test, ενώ $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό και CI 95%.

Πίνακας 23. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	ET0016	Scharlau, Spain
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMO S.A, Greece
Αγαρόζη	Agarose	16500-500	Invitrogen, UK
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	15585-011	BioRad, USA
Διάλυμα TBE	TBE 10x buffer	15581-028	Invitrogen,UK
Διάλυμα ρυθμιστικό χωρίς MgCl ₂	PCR Run Buffer 10x (-MgCl ₂)	Y02028	Invitrogen, UK
Διάλυμα ρυθμιστικό με MgCl ₂	50Mm MgCl ₂	Y02016	Invitrogen, UK
Μάρτυρας DNA	E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder	12373-031	Invitrogen, UK
Χρωστική	10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer	10816-015	Invitrogen, UK
Νερό ελεύθερο Ρησών	Ultra Pure Water	10977-015	Gibco, USA
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dNTP set	10297-018	Invitrogen, UK
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15622805	Invitrogen, UK
Διάλυμα NEB 4	10x NEB Buffer 4 Restriction Endonuclease Buffer	B7004S	New England BioLabs, USA
Περιοστική ενδονουκλεάση Mwo I	Mwo I Restriction Enzyme	R0573L	New England Biolabs, USA
Πολυμεράση Taq	Taq DNA polymerase	18038-042	Invitrogen, UK
Kit εκχύλισης DNA	QiAamp DNA Blood Mini Kit	51104	Qiagen, Germany
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	QiAquick PCR Purification Kit	28106	Qiagen, Germany
Kit εξαγωγής υλικού από γέλη	QiAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen, Germany

Πίνακας 24: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Βαθμονομημένη πιπέτα 0,2-2μL	0,2-2μL pipette, sterile	161010	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 2-20μL	2-20μL pipette, sterile	160210	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 20-100μL	20-100μL pipette, sterile	162510	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 50-200μL	50-200μL pipette, sterile	160510	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 200-1000μL	200-1000μL pipette, sterile	160510	Gilson Inc, USA
Κυβέτες φωτομέτρου	Uvette 220-1600 nm	9520010051	Eppendorf, UK
Μπουκάλι 1000 mL	1L Storage bottles	430518	Corning, USA
Μπουκάλι 250 mL	250 mL Storage bottles	430281	Corning, USA
Μπουκάλι 500 mL	500 mL Storage bottles	430282	Corning, USA
Ρύγχη πιπέτας 10 μL	10 μL sterilised long tips	DL10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 100 μL, με φίλτρο	100 μL sterilised filter tips	DF100ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000 μL	1000 μL sterilised filter tips	DF1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 μL	200 μL sterilised tips	D200ST	Gilson Inc, USA
Πίνακας 11: (συνέχεια)			
Ρύγχη πιπέτας 200 μL, με φίλτρο	200 μL sterilised filter tips	DF200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 30 μL, με φίλτρο	30 μL sterilised filter tips	DF30ST	Gilson Inc, USA
Σωληνάρια γενικής αίματος	VACUETTE® EDTA tubes	454087	Vacurette, USA
Σωληνάριο ορού	Vacutainer® Rapid Serum Tube (RST)	367954	BD Vacutainer, USA
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	6571	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 15 mL	15 mL centrifuge tubes-sterile,	430791	Corning, USA
Sterile Disposable Scalpel	Shangai Medex International	GRF-2980	MedExSupply, USA

9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

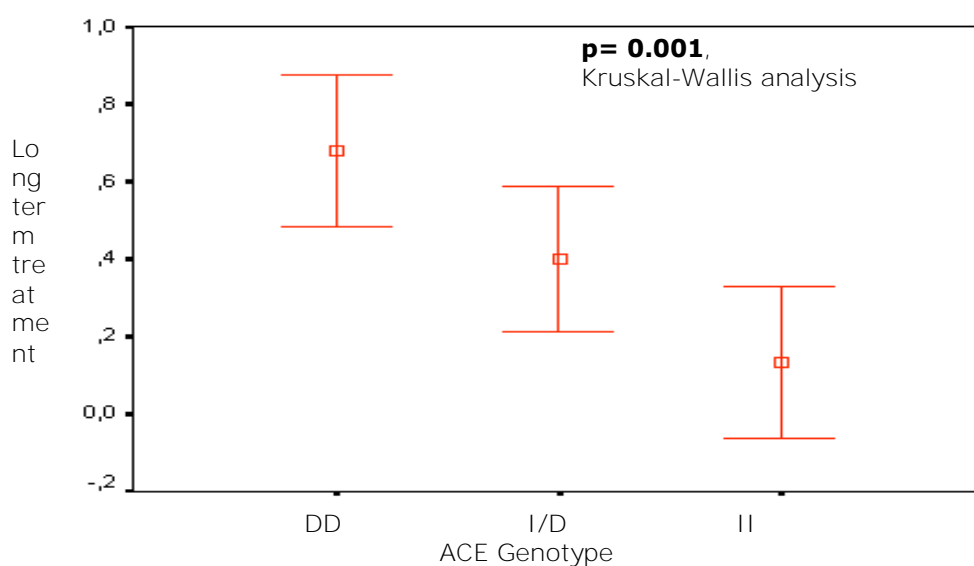
Με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, έγινε ανάλυση των γονοτύπων 70 ασθενών με ΚΑΟ και 103 φυσιολογικών μαρτύρων. Από τα άτομα με ΚΑΟ προέκυψε ότι η συχνότητα του D αλληλίου είναι 64.3% ενώ για το I αλληλίο 35.7%, οπότε παρατηρήσαμε ότι η συχνότητα των αλληλίων I και D δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή μεταξύ των ατόμων με ΚΑΟ της μελέτης μας (ομάδα ελέγχου) και των υγείων ατόμων (ομάδα μαρτύρων), (P= 0.561, Fisher's exact test).

Πίνακας 25. Αποτελέσματα για τον γονότυπο ACE της ομάδας ελέγχου με ΚΑΟ και των φυσιολογικών μαρτύρων. (Τα P value υπολογίστηκαν με Fisher's exact test)

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ	Άτομα με ΚΑΟ συνολικά	Ρουμάνοι (ΚΑΟ)	Έλληνες (ΚΑΟ)
Γονότυπος ACE			
D/ D	25 (v.)	4	21
I/ D	30 (v.)	11	19
I/ I	15 (v.)	4	11
Συχνότητα D αλληλίου	64.3 (%)	50%	59.8
Συχνότητα I αλληλίου	35.7 (%)	50%	40.2
P value	0.561	0.256	1.000
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ			
Γονότυπος ACE			
D/ D	34 (v.)		
I/ D	54 (v.)		
I/ I	15 (v.)		
Συχνότητα D αλληλίου	59.2 (%)		
Συχνότητα I αλληλίου	40.8 (%)		

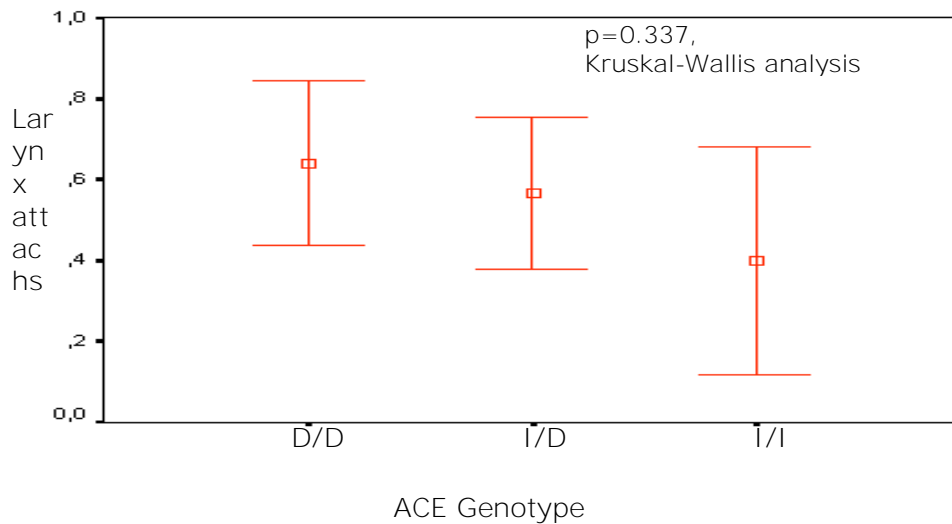
Επίσης δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά και στις συχνότητες των αλληλίων I και D μεταξύ των δύο ομάδων με ΚΑΟ (Ρουμάνοι, Έλληνες) με τους υγιείς μάρτυρες ($p= 0.256$, $p= 1.000$, αντίστοιχα, Fisher's exact test) (Πίνακας 25).

Μετά την συσχέτιση του γονότυπου ACE με την ανάγκη μακράς διάρκειας προφυλακτική θεραπεία προέκυψε το συμπέρασμα ότι άτομα με εισαγωγή (insertion, I) χρειάζονται σε πολύ μικρότερο βαθμό μακράς διάρκεια θεραπεία [$p= 0.001$, Kruskal-Wallis analysis] (εικόνα 26). Η ανάγκη λήψης μακράς διάρκειας αγωγής, είναι ενδεικτική της βαρύτητας της νόσου.



ΕΙΚΟΝΑ 26. Σχέση του γονότυπου ACE με την ανάγκη μακράς διάρκειας προφυλακτική θεραπεία. Όπου 0 = χωρίς μακροχρόνια προφύλαξη, 1=με μακροχρόνια προφύλαξη.

Για τα οιδήματα λάρυγγα η διαφορά μεταξύ των γονοτύπων ACE των ασθενών και στις δύο ομάδες (Ρουμάνοι, Έλληνες) δεν είναι στατιστικά σημαντική, δηλαδή η εκδήλωση οιδημάτων λάρυγγα δεν σχετίζεται με τον γονότυπο του ασθενούς (εικόνα 27). Την ίδια περίπου εικόνα έχουμε και για τα οιδήματα κοιλίας, [$p>0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις].



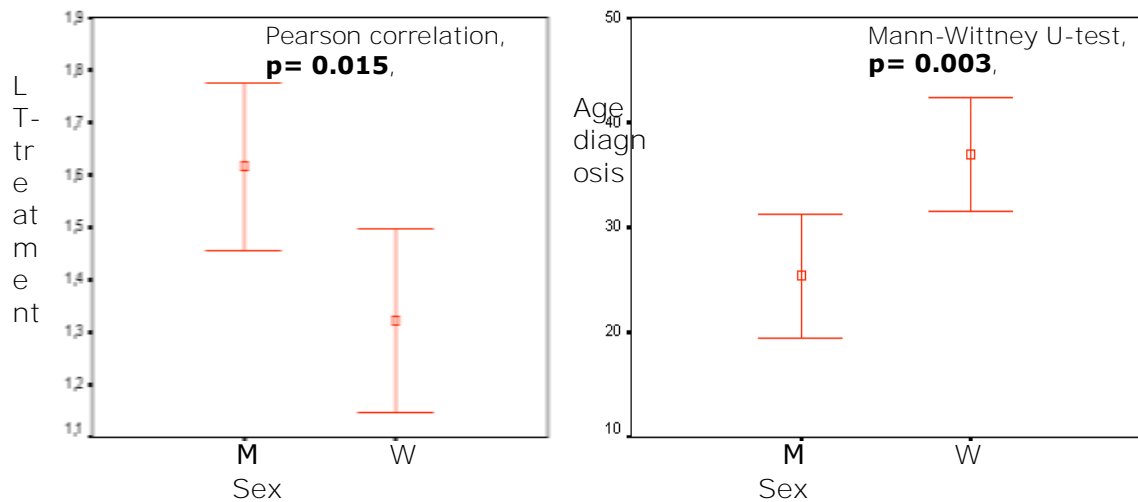
ΕΙΚΟΝΑ 27. Σχέση του γονότυπου ACE με τα επεισόδια οιδήματος λάρυγγα.

Για την σχέση μεταξύ της ηλικίας έναρξης του ΚΑΟ και του γονοτύπου της ACE (και στις 2 κατηγοριοποιήσεις που κάναμε, μία πριν και μετά την ηλικία των 14 ετών, καθώς και πριν και μετά τα 30 έτη), καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν υπάρχει ($p > 0.05$).

Από την ανάλυση επίσης επιβεβαιώνω ότι τα άτομα που χρειάζονται πιο συχνά μακράς διάρκειας θεραπεία είναι αυτά που εκδηλώνουν πιο πρώιμα τη νόσο (τόσο για σε ηλικίες < 14 ετών, όσο και κάτω των 30 ετών) [σε χ^2 & Fisher exact test, $p = 0.003$ και $p = 0.021$, αντίστοιχα].

Επίσης, συμπεραίνω ότι η εντόπιση των κρίσεων (λάρυγγας ή κοιλιακή χώρα) δεν επηρεάζεται από την ηλικία έναρξης της νόσου, [$p > 0.05$, και στις δύο περιπτώσεις].

Τέλος συμπεραίνω ότι οι άνδρες χρειάζονται συχνότερα μακράς διάρκειας θεραπεία ($p = 0.015$, Pearson Correlation). Στη δική μας ομάδα ελέγχου αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι οι άνδρες εμφανίζουν πιο πρώιμα τη νόσο και η διάγνωσή τους έχει γίνει νωρίτερα σε σχέση με τις γυναίκες [Mann-Wittney U-test, $p = 0.003$] (εικόνα 28. Α και 28. Β).



ΕΙΚΟΝΑ 28. Α) Οι άνδρες χρειάζονται συχνότερα μακράς διάρκειας θεραπεία. **Β)** Οι άνδρες εμφανίζουν πιο πρώιμα τη νόσο, στην παρούσα μελέτη, και η διάγνωση τους έχει γίνει νωρίτερα σε σχέση με τις γυναίκες [Mann-Wittney U-test, $p = 0.003$].

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι κλινικές εκδηλώσεις των μονογενετικών διαταραχών, όπως το ΚΑΟ, συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας εμφάνισης της νόσου, της σοβαρότητας και της ανταπόκρισης σε θεραπεία καθορίζονται από την αλληλεπίδραση ενός υπεύθυνου για τη νόσο γονιδίου (στην περίπτωση του ΚΑΟ το *SERPING1*) με άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η χαμηλή συσχέτιση των μεταλλάξεων του υπεύθυνου γονιδίου (*SERPING1*) με τις ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, υποδεικνύουν ότι υπάρχουν και άλλοι γενετικοί παράγοντες εκτός του γονιδίου αυτού, που πιθανόν επηρεάζουν τον φαινότυπο. Κατανοώντας όλους τους εμπλεκόμενους παράγοντες, ίσως προκύψουν καλύτερες εκτιμήσεις για την έκβαση της νόσου αλλά και τις θεραπευτικές μεθόδους.

Λόγω του γεγονότος ότι η βραδυκινίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στον παθογενετικό μηχανισμό του ΚΑΟ, ερευνώντας για παράγοντες που επηρεάζουν τις κλινικές εκδηλώσεις του αγγειοιδήματος, αποφασίσαμε να μελετήσουμε γονίδια, με λειτουργικούς πολυμορφισμούς, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την βραδυκινίνη, όπως ο I/D πολυμορφισμός του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ACE. Το D αλληλίο όπως έχει αποδειχθεί σχετίζεται με τον αυξημένο καταβολισμό της βραδυκινίνης σε σχέση με το I αλληλίο (180), οπότε μπορούμε ίσως να υποθέσουμε ότι οιδήματα μπορούν να εμφανιστούν συχνότερα σε ασθενείς φορείς του I αλληλίου.

Η πρώτη και πολύ πρόσφατη μελέτη στην βιβλιογραφία που πραγματοποιήθηκε βάση αυτών των υποθέσεων, έγινε από τον Freiburger et al. (175). Περιλαμβάνει περίπου 69 άτομα με ΚΑΟ από 37 οικογένειες από την Τσεχία, ενώ σε αντίθεση με την δική μας μελέτη, όλοι οι ασθενείς από την Τσεχία βρίσκονταν σε περίοδο χωρίς θεραπεία. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, που περιλαμβάνει και πολυμορφισμούς γονιδίων για των υποδοχέα βραδυκίνινης B2 και την πρωτεΐνη MBL, δεν επιβεβαιώνουν την συσχέτιση των πολυμορφισμών με τις κρίσεις οιδήματος λάρυγγα και κοιλιακής χώρας, τόσο με τη σοβαρότητα όσο και την εντόπισή τους, καθώς και με κανένα κλινικό χαρακτηριστικό, σε όλες τις ομάδες ασθενών με ΚΑΟ.

Σε κάθε ανάλυση συσχέτισης ενός παράγοντα με τον κλινικό φαινότυπο ενός νοσήματος είναι σημαντικό να υπάρχουν ακριβείς πληροφορίες για τους ασθενείς και τις οικογένειές τους. Σύμφωνα με άλλες μελέτες κατηγοριοποιήσαμε την ομάδα ελέγχου (άτομα με ΚΑΟ), εκτός από την εθνικότητα (Ρουμάνοι, Έλληνες) και σε κατηγορίες με βάση την ηλικία έναρξης (σημαντικός προγνωστικός δείκτης της νόσου), την ηλικία διάγνωσης, τις κρίσεις οιδήματος λάρυγγα και κοιλιακής χώρας και την μακροχρόνια προφύλαξη που 31 από αυτούς λάμβαναν. Η ανάγκη λήψης μακράς διάρκειας αγωγής, είναι ενδεικτική της βαρύτητας της νόσου, δηλαδή λήψη της σημαίνει κατά κανόνα συχνές κρίσεις. Για να μελετήσουμε επίσης καλύτερα τα αποτελέσματα διακρίναμε δύο ηλικιακές ομάδες, μία πριν και μετά την ηλικία των 14 ετών (παιδική ηλικία ή όχι), καθώς και πριν και μετά τα 30 έτη. Επειδή το ΚΑΟ είναι ένα σπάνιο νόσημα και τα δείγματα προς ανάλυση είναι ιδιαίτερος δύσκολο να συλλεχτούν, ο αριθμός των δειγμάτων ήταν περιορισμένος. Από αυτά τα περισσότερα δείγματα είχαν οικογενειακό ιστορικό, μερικά όχι, καθώς και 5 δεν έχουν εμφανίσει κλινικά συμπτώματα.

Αρχικά διαπιστώσαμε ότι η συχνότητα του D και I αλληλίου δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ατόμων με ΚΑΟ και των υγιών ατόμων. Στην ομάδα των ατόμων με ΚΑΟ που λαμβάνει μακροχρόνια προφύλαξη, σημαντικό είναι το εύρημα ότι οι ασθενείς με εισαγωγή (I αλληλίο) χρειάζονται σε πολύ μικρότερο βαθμό μακροχρόνια προφύλαξη, [$p= 0.001$, Kruskal-Wallis analysis]. Είναι θεωρητικά αναμενόμενο αποτέλεσμα σε σχέση με τη λειτουργική σημασία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει περιγραφεί κάτι παρόμοιο σε ΚΑΟ. Επομένως η παρουσία του I αλληλίου σχετίζεται έμμεσα με τον κλινικό φαινότυπο, καθώς, όπως γνωρίζουμε, η λήψη μακροχρόνιας αγωγής σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου, όσο πιο συχνές και σοβαρές είναι οι κρίσεις ΚΑΟ οι ασθενείς λαμβάνουν μακροχρόνια προφύλαξη.

Επίσης και στην δική μας μελέτη, επιβεβαιώσαμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του γονοτύπου της ACE με τις κρίσεις οιδήματος λάρυγγα, με τις κρίσεις κοιλιακής χώρας και με την ηλικία έναρξης της νόσου που αποτελούν κλινικά χαρακτηριστικά πολλών ασθενών. Το αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με την προηγούμενη μελέτη (175).

Από τα ευρήματα που προέκυψαν, τα σημαντικότερα είναι ότι η εντόπιση των κρίσεων (λάρυγγας ή κοιλιακή χώρα) δεν επηρεάζεται από την ηλικία έναρξης της νόσου, σε αντίθεση με την σοβαρότητα των επεισοδίων που σχετίζεται με την ηλικία έναρξης (αποτελεί τον βασικό προγνωστικό δείκτη της νόσου). Ταυτόχρονα επιβεβαιώσαμε τον ισχυρισμό ότι άτομα που χρειάζονται πιο συχνά μακροχρόνια προφύλαξη είναι αυτά που εκδηλώνουν πιο πρώιμα τη νόσο. Τέλος, διαπιστώσαμε ότι οι άνδρες χρειάζονται συχνότερα μακροχρόνια προφύλαξη. Ωστόσο αυτό θεωρητικά μπορεί να οφείλεται στο ότι γενικά (αν και όχι πάντα) ανδρογόνα τείνουμε να μη δίνουμε εύκολα σε γυναίκες (τουλάχιστον για θεραπείες πολύ μεγάλης διάρκειας). Ωστόσο στη δική μας περίπτωση αυτό μπορεί να οφείλεται κυρίως στο ότι οι άνδρες εμφανίζουν πιο πρώιμα τη νόσο (αν και οριακά μη στατιστικά σημαντικό $p=0.080$) και η διάγνωσή τους έχει γίνεται νωρίτερα σε σχέση με τις γυναίκες.

Συμπερασματικά, η διερεύνηση του λειτουργικού πολυμορφισμού I/D του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ACE στον κλινικό φαινότυπο του ΚΑΟ φαίνεται να υποστηρίζει τον πιθανό ρόλο που διαδραματίζει το γονίδιο αυτό στην νόσο. Λόγο όμως της ποικίλης κλινικής εικόνας του ΚΑΟ, φαίνεται ότι και πολλοί άλλοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες εμπλέκονται στον μηχανισμό παθογένεσης. Επίσης πρέπει να τονίσουμε, ότι η μελέτη έγινε σε συγκεκριμένο αριθμό ατόμων, από δύο μόνο εθνικότητες, επειδή το νόσημα είναι εξαιρετικά σπάνιο. Αποτελέσματα και από άλλες μελέτες, με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και οικογενειών, όπως και σε άλλους λειτουργικούς πολυμορφισμούς που εμπλέκονται στον καταβολισμό της βραδυκινίνης, πιστεύουμε ότι θα επιφέρουν ακόμα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα για το φαινότυπο του ΚΑΟ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bowen B, Hawk JJ, Sibunka S, Hovick S, Weiler JM. A review of the reported defects in the human C1 esterase inhibitor gene producing hereditary angioedema including four new mutations. Clin Immunol 2001; 98: 157–63.

2. Kalmar L, Hegedus T, Farkas H, Nagy M, Tordai A. HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Hum Mutat* 2005;25:1–5.
3. Davis AE III. The pathophysiology of hereditary angioedema. *Clin Immunol* 2005;114:3–9.
4. Aussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 1998;6:351
5. Varga L, Szeplaki G, Laki J et al. Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol* 2008;153:68–74.
6. Konrad Bork, Rouven Kleist, Jochen Hardt and Gu" nther Witzke Kallikrein–kinin system and fibrinolysis in hereditary angioedema due to factor XII gene mutation Thr309Lys *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2009, 20: 325–332
7. Bruce L. Zuraw, Hereditary Angioedema *N Engl J Med* 2008; 359: 1027-36.
8. Marco Cicardi . Lorenza Zingale . Andrea Zanichelli . Emanuela Pappalardo . Benedetta Cicardi C1 inhibitor: molecular and clinical aspects Springer *Semin Immun* 2005 27:286–298
9. Γερμενής Α. Το Σύστημα του Συμπληρώματος Κλινική Προσέγγιση ιατρικές εκδόσεις Βήτα Αθήνα copyright 1993 ISBN: 960- 7308- 27-1
10. Fred S. Rosen Alvin E. Davis Deficiencies of C1 inhibitor *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* Vol. 19, No. 2, pp. 251–261, 2005
11. Longhurst H., Cicardi M. Hereditary angio-oedema *Lancet* 2012; 379: 474–81
12. Agostoni A, Cicardi M. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992; 71: 206–15.
13. Bork K, Hardt J, Schicketanz KH, Ressel N. Clinical studies of sudden upper airway obstruction in patients with hereditary angio-oedema due to C1 esterase inhibitor deficiency. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1229–35.
14. Weis M: Clinical review of hereditary angioedema: diagnosis and management. *Postgrad Med* 2009; 121: 113–120.
15. Bork K, Siedlecki K, Bosch S, Schopf RE, Kreuz W. Asphyxiation by laryngeal edema in patients with hereditary angio-oedema. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 349–54.
16. Farkas H, Harmat G, Kaposi PN, et al. Ultrasonography in the diagnosis and monitoring of ascites in acute abdominal attacks of hereditary angioneurotic oedema. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1225–30.

17. Bork K, Staubach P, Eckardt AJ, Hardt J. Symptoms, course, and complications of abdominal attacks in hereditary angio-oedema due to C1 inhibitor deficiency. *Am J Gastroenterol*; 101: 619–27.
18. Bork K, Meng G, Staubach P, Hardt J. Treatment with C1 inhibitor concentrate in abdominal pain attacks of patients with hereditary angio-oedema. *Transfusion* 2005; 45: 1774–84.
19. Bygum A. Hereditary angio-oedema in Denmark: a nationwide survey. *Br J Dermatol* 2009; 161: 1153–58.
20. Prematta MJ, Kemp JG, Gibbs JG, Mende C, Rhoads C, Craig TJ. Frequency, timing, and type of prodromal symptoms associated with hereditary angio-oedema attacks. *Allergy Asthma Proc* 2009; 30: 506–11.
21. Farkas H, Varga L, Szeplaki G, Visy B, Harmat G, Bowen T. Management of hereditary angio-oedema in pediatric patients. *Pediatrics* 2007; 120: e713–22.
22. Bork K, Barnstedt SE. Laryngeal edema and death from asphyxiation after tooth extraction in four patients with hereditary angio-oedema. *J Am Dent Assoc* 2003; 134: 1088–94.
23. Bork K, Fischer B, Dewald G. Recurrent episodes of skin angio-oedema and severe attacks of abdominal pain induced by oral contraceptives or hormone replacement therapy. *Am J Med* 2003; 114: 294–98.
24. Bouillet L, Longhurst H, Boccon-Gibod I, et al. Disease expression in women with hereditary angio-oedema. *Am J Obstet Gynaecol* 2008; 199: 484.
25. Farkas H, Fust G, Fekete B, Karadi I, Varga L. Eradication of *Helicobacter pylori* and improvement of hereditary angioneurotic oedema. *Lancet* 2001; 358: 1695–96.
26. Visy B, Fust G, Bygum A, et al. *Helicobacter pylori* infection as a triggering factor of attacks in patients with hereditary angio-oedema. *Helicobacter* 2007; 12: 251–57.
27. Blasko B, Szeplaki G, Varga L, et al. Relationship between the copy numbers of genes (C4A, C4B) encoding the fourth component of complement and the clinical course of hereditary angio-oedema (HAE). *Mol Immunol* 2007; 44: 2667–74
28. Carter PE, Duponchel C, Tosi M, Fothergill JE. Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of alu elements. *Eur J Biochem*. 1991;197:301-8.
29. Cooper DN, Krawczak M. Mechanisms of insertional mutagenesis in human genes causing genetic disease. *Hum Genet*. 1991;87:409-15

30. Stoppa-Lyonnet D, Tosi M, Laurent J, Sobel A, Lagrue G, Meo T. Altered C1 inhibitor genes in type I hereditary angioedema. *N Engl J Med*. 1987;317:1-6.
31. Stoppa-Lyonnet D, Carter PE, Meo T, Tosi M. Clusters of intragenic alu repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:1551-5.
32. Stoppa-Lyonnet D, Duponchel C, Meo T, Laurent J, Carter PE, Arala-Chaves M, Cohen JHM, Dewald G, Goetz J, Hauptmann G, Lagrue G, Lesavre P, Lopez-Trascasa M, Misiano **G, Moraine C, Sobel A, Späth PJ, Tosi M. Recombinational biases in the rearranged C1 inhibitor genes of hereditary angioedema patients.** *Am J Hum Genet*. 1991;49:1055-62.
33. Carugati A, Pappalardo E, Zingale LC, Cicardi M. C1-inhibitor deficiency and angioedema. *Mol Immunol*. 2001;38:161-73.
34. **López-Lera A, Favier B, Mena de la Cruz R, Garrido S, Drouet C, López-Trascasa M.** A new case of homozygous C1-inhibitor deficiency suggests a role for Arg378 in the control of kinin pathway activation. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:1307- 10.e3.
35. Gompels MM, Lock RJ, Morgan JE, Osborne J, Brown A, Virgo PF. A multicenter evaluation of the diagnostic efficiency of serological investigations for C1 inhibitor deficiency. *J Clin Pathol* 2002; 55: 145–47.
36. Tarzi MD, Hickey A, Forster T, Mohammadi M, Longhurst HJ. An evaluation of tests used for the diagnosis and monitoring of C1 inhibitor deficiency: normal serum C4 does not exclude hereditary angio-oedema. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 513–16.
37. Rosen FS, Pensky J, Donaldson V, Charache P. Hereditary angioneurotic edema: two genetic variants. *Science* 1965; 148: 957–58.
38. Cicardi M, Zingale LC, Pappalardo E, Folcioni A, Agostoni A. Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1-inhibitor deficiencies. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 274–81.
39. Bowen T, Cicardi M, Farkas H, et al. 2010 international consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angio-oedema. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010; 6: 24.
40. Khan S, Tarzi MD, Dore PC, Sewell WA, Longhurst HJ. Secondary systemic lupus erythematosus: an analysis of 4 cases of uncontrolled hereditary angio-oedema. *Clin Immunol* 2007; 123: 14–17.
41. Cacoub P, Fremeaux-Bacchi V, De Lacroix I, et al. A new type of acquired C1 inhibitor deficiency associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1836–40.
42. Grigoriadou S, Longhurst HJ. Clinical immunology review series: an approach to the patient with angio-oedema. *Clin Exp Immunol* 2009; 155: 367–77.

43. Zingale LC, Beltrami L, Zanichelli A, et al. Angio-oedema without urticaria: a large clinical survey. *CMAJ* 2006; 175: 1065–70.
44. Bowen T, Cicardi M, Bork K, et al. Hereditary angio-oedema: a current state-of-the-art review, VII: Canadian Hungarian 2007 International Consensus Algorithm for the diagnosis, therapy, and management of hereditary angio-oedema. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 100 (suppl 2): S30–40.
45. Cicardi M, Bork K, Caballero T, for the HAWK (Hereditary Angioedema International Working Group). Evidence-based recommendations management of angioedema owing to hereditary C1 inhibitor deficiency: consensus report of an International Working Group. *Allergy* 2012; 67: 147–57.
46. Blohme G. Treatment of hereditary angioneurotic oedema with tranexamic acid. A random double-blind cross-over study. *Acta Med Scand* 1972; 192: 293–98.
47. Frank M, Gelfand JA, Alling DW, Sherins RJ. Epsilon aminocaproic acid for hereditary angio-oedema. *N Engl J Med* 1977; 296: 1235–36.
48. Cicardi M, Banerji A, Bracho F, et al. Icatibant, a new bradykinin receptor antagonist, in hereditary angio-oedema. *N Engl J Med* 2010; 363: 532–41.
49. European Medicines Agency. European public assessment report of Firazyr (icatibant) for the public. February, 2011
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/000899/WC500022968.pdf (accessed Feb 22, 2011).
50. Gelfand JA, Sherins RJ, Alling DW, Frank MM. Treatment of hereditary angio-oedema with danazol: reversal of clinical and biochemical abnormalities. *N Engl J Med* 1976; 295: 1444–48.
51. Sheffer AL, Fearon DT, Austen KF. Clinical and biochemical effects of stanozolol therapy for hereditary angio-oedema. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 181–87.
52. Cicardi M, Castelli R, Zingale LC, Agostoni A. Side effects of long-term prophylaxis with attenuated androgens in hereditary angio-oedema: comparison of treated and untreated patients. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 194–96.
53. Gompels MM, Lock RJ, Abinun M, et al. C1 inhibitor deficiency: consensus document. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 379–94.
54. Zuraw BL, Busse PJ, White M, et al. Nanofiltered C1 inhibitor concentrate for treatment of hereditary angio-oedema. *N Engl J Med* 2010; 363: 513–22.
55. US Food and Drug Administration. Summary basis for regulatory action—Cinryze. Oct 9, 2008. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts>

/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/ucm093617. htm (accessed Feb 21, 2011).

56. Van Sickels NJ, Hunsaker RB, Van Sickels JE. Hereditary angio-oedema: treatment, management, and precautions in patients presenting for dental care. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 168–72.
57. Prematta M, Gibbs JG, Pratt EL, Stoughton TR, Craig TJ. Fresh frozen plasma for the treatment of hereditary angio-oedema. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 98: 383–88.
58. Bork K, Frank J, Grundt B, Schlattmann P, Nussberger J, Kreuz W. Treatment of acute edema attacks in hereditary angio-oedema with a bradykinin receptor-2 antagonist (Icatibant). *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1497–503.
59. Bork K, Staubach P, Hardt J. Treatment of skin swellings with C1-inhibitor concentrate in patients with hereditary angio-oedema *Allergy* 2008; 63: 751–57.
60. Craig TJ, Levy RJ, Wasserman RL, et al. Efficacy of human C1 esterase inhibitor concentrate compared with placebo in acute hereditary angio-oedema attacks. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 801–08.
61. Farkas H, Jakab L, Temesszentandrási G, et al. Hereditary angio-oedema: a decade of human C1-inhibitor concentrate therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 941–47.
62. Longhurst H. Rhucin, a recombinant C1 inhibitor for the treatment of hereditary angio-oedema and cerebral ischemia. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 310–23.
63. van Doorn MB, Burggraaf J, van Dam T, et al. A phase I study of recombinant human C1 inhibitor in asymptomatic patients with hereditary angio-oedema. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 876–83.
64. Waytes AT, Rosen FS, Frank MM. Treatment of hereditary angio-oedema with a vapor-heated C1 inhibitor concentrate. *N Engl J Med* 1996; 334: 1630–34.
65. Kunschak M, Engl W, Maritsch F, et al. A randomized, controlled trial to study the efficacy and safety of C1 inhibitor concentrate in treating hereditary angio-oedema. *Transfusion* 1998; 38: 540–49.
66. Choi G, Soeters MR, Farkas H, et al. Recombinant human C1-inhibitor in the treatment of acute angio-oedema attacks. *Transfusion* 2007; 47: 1028–32 *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69: 2 / 179–186 12.
67. Martínez-Saguer I, Rusicke E, Aygören-Pürsün E, von Hentig N, Klingebiel T, Kreuz W. Pharmacokinetic analysis of human plasma-derived pasteurized C1-inhibitor concentrate in adults and children with hereditary angio-oedema: a prospective study. *Transfusion* 2010; **50**: 354–60.

68. Levy RJ, Lumry WR, McNeil DL, et al. EDEMA4: a phase 3, double-blind study of subcutaneous ecallantide treatment for acute attacks of hereditary angio-oedema. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; **104**: 523–29.
69. Schneider L, Lumry W, Vegh A, Williams AH, Schmalbach T. Critical role of kallikrein in hereditary angio-oedema pathogenesis: A clinical trial of ecallantide, a novel kallikrein inhibitor. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120**: 416–22.
70. Cicardi M, Levy RJ, McNeil DL, et al. Ecallantide for the treatment of acute attacks in hereditary angio-oedema. *N Engl J Med* 2010; **363**: 523–31.
71. F.A. Sayed-Tabatabaei, B.A. Oostra, A. Isaacs, C.M. van Duijn and J.C.M. Witteman **ACE** Polymorphisms *Circulation Research* 2006, 98: 1123-1133
72. Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest.* 1987;56: 345–348.
73. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med.* 2004;116:263–272.
74. 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.
75. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. 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.
76. 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.
77. 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.
78. Mellick GD, Buchanan DD, McCann SJ, Davis DR, Le Couteur DG, Chan D, Johnson AG. **The ACE deletion polymorphism is not associated with Parkinson’s disease.** *Eur Neurol.* 1999;41:103–106.
- 79 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.
80. Baghai TC, Schule C, Zill P, Deiml T, Eser D, Zwanzger P, Ella R, Rupprecht R, Bondy B. The angiotensin I converting enzyme insertion/ deletion polymorphism influences

therapeutic outcome in major depressed women, but not in men. *Neurosci Lett.* 2004;363:38–42.

81. Baghai TC, Schule C, Zwanzger P, Minov C, Zill P, Ella R, Eser D, Oezer S, Bondy B, Rupprecht R. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis dysregulation in patients with major depression is influenced by the insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene. *Neurosci Lett.* 2002;328:299–303. disorders. *Biol Psychiatry.* 1996;40:1122–1127.

82. 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.

83. **Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease.** *Neuron.* 1991;6:487–498.

84. van Duijn CM, Hendriks L, Cruts M, Hardy JA, Hofman A, Van Broeckhoven C. Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset **Alzheimer's disease.** *Lancet.* 1991;337:978.

85. 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.

86. Kregge JH, John SW, Langenbach LL, Hodgins JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette **JC, O'Brien DA, Smithies O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice.** *Nature.* 1995;375:146–148.

87. 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.

88. Coates D, Isaac RE, Cotton J, Siviter R, Williams TA, Shirras A, Corvol P, Dive V. Functional conservation of the active sites of human and *Drosophila* angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry.* 2000;39:8963–8969.

89. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ Res.* 2000;87:E1–9.

90. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000;275:33238–33243.

91. 21. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1–7). *Hypertension.* 1997;30:535–541

92. Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:93–101. Sayed-Tabatabaei et al ACE Polymorphisms 1131 Downloaded from <http://circres.ahajournals.org/> by guest on March 26, 2012
93. Turner AJ. Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. *Biochem Soc Trans.* 2003;31: 723–727.
94. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002;277:14838 –14843.
95. Ferrario CM, Averill DB, Brosnihan KB, Chappell MC, Iskandar SS, Dean RH, Diz DI. Vasopeptidase inhibition and Ang-(1–7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int.* 2002;62:1349 –1357.
96. Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D, Warnet JM, Corvol P. Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. *J Lab Clin Med.* 1991;117:33–39.
97. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovo R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. *Am J Hum Genet.* 1988;43:774 –780.
98. 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.
99. 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: 33–40.
100. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation.* 1995; 92:1387–1388.
101. Ueda S, Elliott HL, Morton JJ, Connell JM. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 1995; 25: 1266–9.
102. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1411–20.
103. Bantis C, Heering PJ, Luther Y, Aker S, Kuhr N, Grabensee B, Ivens K. Influence of cytokine gene polymorphisms on focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Nephrol* 2004; 24: 427–31.

104. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/ deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:1433.
105. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl.* 1993;3:120 –121.
106. Villard E, Tired L, Visvikis S, Rakotovao R, Cambien F, Soubrier F. Identification of new polymorphisms of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two-QTL segregation-linkage analysis. *Am J Hum Genet.* 1996;58: 1268–1278.
107. Keavney B, McKenzie CA, Connell JM, Julier C, Ratcliffe PJ, Sobel E, Lathrop M, Farrall M. Measured haplotype analysis of the angiotensin-I converting enzyme gene. *Hum Mol Genet.* 1998;7:1745–1751.
108. Castiglione CM, Deina AS, Speed WC, Sirugo G, Rosenbaum HC, Zhang Y, Grandy DK, Grigorenko EL, Bonne-Tamir B, Pakstis AJ, Kidd R, Kidd KK. Evolution of haplotypes at the DRD2 locus. *Am J Hum Genet.* 1995;57:1445–1456.
109. Tishkoff SA, Dietzsch E, Speed W, Pakstis AJ, Kidd JR, Cheung K, Bonne-Tamir B, Santachiara-Benerecetti AS, Moral P, Krings M. Global patterns of linkage disequilibrium at the CD4 locus and modern human origins. *Science.* 1996;271:1380 –1387.
110. Tishkoff SA, Goldman A, Calafell F, Speed WC, Deina AS, Bonne-Tamir B, Kidd JR, Pakstis AJ, Jenkins T, Kidd KK. A global haplotype analysis of the myotonic dystrophy locus: implications for the evolution of modern humans and for the origin of myotonic dystrophy mutations. *Am J Hum Genet.* 1998;62:1389 –1402.
111. Zhu X, McKenzie CA, Forrester T, Nickerson DA, Broeckel U, Schunkert H, Doering A, Jacob HJ, Cooper RS, Rieder MJ. Localization of a small genomic region associated with elevated ACE. *Am J Hum Genet.* 2000;67:1144 –1153.
112. Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet.* 1992;1:72–75.
113. Schmidt S, van Hooft IM, Grobbee DE, Ganten D, Ritz E. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. *J Hypertens.* 1993;11: 345–348.
114. Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GA. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* 1994;330:1634 –1638.

115. Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, Kinoshita M. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1994;90:2622–2628.
116. Castellano M, Glorioso N, Cusi D, Sarzani R, Fabris B, Opocher G, Zoccali C, Golin R, Veglio F, Volpe M, Mantero F, Fallo F, Rossi GP, Barlassina C, Tizzoni L, Filigheddu F, Giacche M, Rossi F. Genetic polymorphism of the renin-angiotensin-aldosterone system and arterial hypertension in the Italian population: the GENIPER Project. *J Hypertens*. 2003;21:1853–1860.
117. Vasku A, Soucek M, Znojil V, Rihacek I, Tschoplova S, Strelcova L, Cidl K, Blazkova M, Hajek D, Holla L, Vacha J. Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen gene interaction and prediction of essential hypertension. *Kidney Int*. 1998;53:1479–1482.
118. Tiret L, Blanc H, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, Tichet J, Mallet C, Poirier O, Plouin PF, Cambien F. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. **Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle**. *J Hypertens*. 1998;16:37–44.
119. Agachan B, Isbir T, Yilmaz H, Akoglu E. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Exp Mol Med*. 2003;35:545–549.
120. Kario K, Hoshida S, Umeda Y, Sato Y, Ikeda U, Nishiuma S, Matsuo M, Shimada K. Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genotypes, and day and night blood pressures in elderly Japanese hypertensives. *Hypertens Res*. 1999;22:95–103.
121. Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, Gonzalez D, Coca A, De La Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension*. 2000;35:512–517.
122. Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens*. 1997;15:1579–1592.
123. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:484–492.
124. Agarwal A, Williams GH, Fisher ND. Genetics of human hypertension. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16:127–133.
125. Sayed-Tabatabaei FA, Houwing-Duistermaat JJ, van Duijn CM, Witteman JC. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a

meta-analysis. *Stroke*. 2003;34: 1634–1639. 1132 *Circulation Research* May 12, 2006
Downloaded from <http://circres.ahajournals.org/> by guest on March 26, 2012

126. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*. 1992;359: 641–644.

127. Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L, Delepine M, Lathrop M, Peto R, Collins R. Large-scale test of hypothesized associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/ deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. *International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaborators. Lancet*. 2000;355:434–442.

128. Kitsios G, Zintzaras E. Genetic variation associated with ischemic heart failure: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2007 Sep 15;166(6):619-33. Epub 2007 Jul 21.

129. Sharma P. Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;64:227–230.

130. Maeda Y, Ikeda U, Ebata H, Hojo Y, Seino Y, Hayashi Y, Kuroki S, Shimada K. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertensive individuals with parental history of stroke. *Stroke*. 1996;27: 1521–1523.

131. G. Kitsios, E. Zintzaras. ACE (I/D) polymorphism and response to treatment in coronary artery disease: a comprehensive database and meta-analysis involving study quality evaluation. *BMC Medical Genetics* 2009, 10:50 doi:10.1186/1471-2350-10-50

132. Ng DP, Tai BC, Koh D, Tan KW, Chia KS. Angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with diabetic nephropathy: a meta-analysis of studies reported between 1994 and 2004 and comprising 14,727 subjects. *Diabetologia*. 2005;48:1008 –1016.

133. Tian-Biao Zhou¹, Chao Ou², Yuan-Han Qin¹, Li-Na Su¹, Feng-Ying Lei¹, Wei-Fang Huang¹, Yan-Jun Zhao¹, Yu-Sheng Pang¹ and Kun-Peng Yang³ Association of angiotensin converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism with idiopathic nephrotic syndrome susceptibility in children: a meta-analysis. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2011 12: 601.

134. Qin YH, Zhou TB, Su LN, Lei FY, Huang WF, Zhao YJ. Association between ACE polymorphism and risk of IgA nephropathy: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011 Sep;12(3):215-23

135. Ng DP, Tai BC, Lim XL. Is the presence of retinopathy of practical value in defining cases of diabetic nephropathy in genetic association studies? The experience with the ACE

insertion/deletion polymorphism in 53 studies comprising 17,791 subjects. *Diabetes*. 2008 Sep;57(9):2541-6.

136. Pereira TV, Nunes AC, Rudnicki M, Magistrini R, Albertazzi A, Pereira AC, Krieger JE. Influence of ACE I/D gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease: a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Nov;21(11):3155-63.

137. Tian-Biao Zhou, Yuan-Han Qin, Li-Na Su, Feng-Ying Lei, Wei-Fang Huang, Yan-Jun Zhao, Yu-Sheng Pang and Kun-Peng Yang. The association between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene variant and risk of focal segmental glomerulosclerosis: a systematic review and meta-analysis *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2011 12: 624

138. Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens*. 1997 Dec;15(12 Pt 2):1579-92.

139. Piero Ruggenenti, Paola Bettinaglio, Franck Pinares, Giuseppe Remuzzi Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism and Renoprotection in Diabetic and Nondiabetic Nephropathies *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 1511–1525, 2008.

140. Scharplatz M., Puhan MA, Steurer J, Bachmann LM. What is the impact of the ACE gene insertion/deletion (I/D) polymorphism on the clinical effectiveness and adverse events of ACE inhibitors? – Protocol of a systematic review *BMC Medical Genetics* 2004, 5:23 doi:10.1186/1471-2350-5-23.

141. Kehoe PG, Russ C, McIlory S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, Liddell M, Plomin R, Dynan K, Williams N, Neal J, Cairns NJ, Wilcock G, Passmore P, Lovestone S, Williams J, Owen MJ. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1999; 21:71–72.

142. Lehmann DJ, Cortina-Borja M, Warden DR, Smith AD, Sleegers K, Prince JA, van Duijn CM, Kehoe PG. Large meta-analysis establishes the ACE insertion-deletion polymorphism as a marker of Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol*. 2005;162:305–317.

143. Kehoe PG, Katzov H, Feuk L, Bennet AM, Johansson B, Wiman B, de Faire U, Cairns NJ, Wilcock GK, Brookes AJ, Blennow K, Prince JA. Haplotypes extending across ACE are associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2003;12:859–867.

144. Akcali C, Ozkur M, Erbagci Z, Benlier N, Aynacioglu AS. Association of insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with angio-oedema accompanying chronic urticaria but not chronic urticaria without angio-oedema or the autologous serum skin test response, *J. European Academy of Dermatology and Venereology* 2008, 22 , 83–86

145. Angela Passaro, Edoardo Dalla Nora, Caterina Marcello, Francesca Di Vece, Mario Luca Morieri, Juana M Sanz, Cristina Bosi, Renato Fellin and Giovanni Zuliani PPAR γ Pro12Ala and ACE ID polymorphisms are associated with BMI and fat distribution, but not metabolic syndrome Cardiovascular Diabetology 2011, 10:112

146. Ge'za Bokodi, Andra's Treszl, Lajos Kova'cs, Tivadar Tulassay, and Barna Va'sa'rhelyi2 Dysplasia: A Review Pediatric Pulmonology 2007 42:952–961.

147. Vasileia Varvarigou, Issa J. Dahabreh, Atul Malhotra, Stefanos N. Kales, A Review of Genetic Association Studies of Obstructive Sleep Apnea: Field Synopsis and Meta-Analysis SLEEP, Vol. 34, No. 11, 2011

148. Snezana Lukic, Aleksandra Nikolic, Tamara Alempijevic, Dragan Popovic, Aleksandra Sokic Milutinovic , Milenko Ugljesic , Srbislav Knezevic, Biljana Milicic, Dragica Dinic, Dragica Radojkovic. Angiotensin-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism in Patients with Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Dig Surg 2011;28:258–262

149. Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, Prasad K, Losi MA, Hemingway H, Statters D, Jubb M, Girvain M, Varnava A, World M, Deanfield J, Talmud P, McEwan JR, McKenna WJ, Humphries S. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. Circulation. 1997;96:741–747.

150. Montgomery HE, Marshall R, Hemingway H, Myerson S, Clarkson P, Dollery C, Hayward M, Holliman DE, Jubb M, World M, Thomas EL, Brynes AE, Saeed N, Barnard M, Bell JD, Prasad K, Rayson M, Talmud PJ, Humphries SE. Human gene for physical performance. Nature. 1998; 393:221–222.

151. Gayagay G, Yu B, Hambly B, Boston T, Hahn A, Celermajer DS, Trent RJ. Elite endurance athletes and the ACE I allele– the role of genes in athletic performance. Hum Genet. 1998;103:48 –50.

152. Myerson S, Hemingway H, Budget R, Martin J, Humphries S, Montgomery H. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. J Appl Physiol. 1999;87:1313–1316.

153. Nazarov IB, Woods DR, Montgomery HE, Shneider OV, Kazakov VI, Tomilin NV, Rogozkin VA. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. Eur J Hum Genet. 2001;9:797– 801.

154. Alvarez R, Terrados N, Ortolano R, Iglesias-Cubero G, Reguero JR, Batalla A, Cortina A, Fernandez-Garcia B, Rodriguez C, Braga S, Alvarez V, Coto E. Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance. Eur J Appl Physiol. 2000;82:117–120.

155. Woods D, Hickman M, Jamshidi Y, Brull D, Vassiliou V, Jones A, Humphries S, Montgomery H. Elite swimmers and the D allele of the ACE I/D polymorphism. *Hum Genet.* 2001;108:230–232.
156. Tsianos G, Sanders J, Dhamrait S, Humphries S, Grant S, Montgomery H. The ACE gene insertion/deletion polymorphism and elite endurance swimming. *Eur J Appl Physiol.* 2004;92:360–362.
157. Bas M, Hoffmann TK, Tiemann B, Dao VT, Bantis C, Balz V, Schultz-Coulon HJ, Stark T, Schuler P, Greve J, Ivens K, Bier H, Kojda G Potential genetic risk factors in angiotensin-converting enzyme-inhibitor-induced angio-oedema. *Br J Clin Pharmacol.* 2010 Feb;69(2):179-86.
158. Agostoni A, Cicardi M, Cugno M, Zingale LC, Gioffre D, Nussberger J. Angioedema due to angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Immunopharmacology* 1999; 44: 21–5.
159. Messerli FH, Nussberger J. Vasopeptidase inhibition and angio-oedema. *Lancet* 2000; 356: 608–9.
160. Bas M, Hoffmann TK, Bier H, Kojda G. Increased C-reactive protein in ACE-inhibitor-induced angioedema. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 59: 233–8.
161. Vleeming W, van Amsterdam JG, Stricker BH, De Wildt DJ. ACE inhibitor-induced angioedema. Incidence, prevention and management. *Drug Saf* 1998; 18: 171–88.
162. Adam A, Cugno M, Molinaro G, Perez M, Lepage Y, Agostoni A. Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet* 2002; 359:2088–9.
163. Lefebvre J, Murphey LJ, Hartert TV, Jiao SR, Simmons WH, Brown NJ. Dipeptidyl peptidase IV activity in patients with ACE-inhibitor-associated angioedema. *Hypertension* 2002;39: 460–4.
164. Molinaro G, Cugno M, Perez M, Lepage Y, Gervais N Agostoni A, Adam A. Angiotensin converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine(9)-bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 232–7.
165. Nussberger J, Cugno M, Cicardi M. Bradykinin-mediated angioedema. *N Engl J Med* 2002; 347: 621–2.
166. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 1998; 351: 1693–7.
167. Sigler C, Annis K, Cooper K, Haber H, Van deCarr S. Examination of baseline levels of carboxypeptidase N and complement components as potential predictors of angioedema associated with the use of an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Arch Dermatol* 1997; 133: 972–5.

168. Adam A, Cugno M, Molinaro G, Perez M, Lepage Y, Agostoni A. Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet* 2002; 359: 2088-9
169. Duan QL, Nikpoor B, Dube MP, Molinaro G, Meijer IA, Dion P et al. A variant in XPNPEP2 is associated with angioedema induced by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Am J Hum Genet* 2005; 77(4):617-26.
170. Braun A, Maier E, Kammerer S, Muller B, Roscher AA. A novel sequence polymorphism in the promoter region of the human B2-bradykinin receptor gene. *Hum Genet* 1996; 97: 688-9.
171. Braun A, Kammerer S, Bohme E, Muller B, Roscher AA. Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B2 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 234-40.
172. Braun A, Kammerer S, Maier E, Bohme E, Roscher AA. Polymorphisms in the gene for the human B2-bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases. *Immunopharmacology* 1996; 33: 32-5.
173. Cumming SA, Halsall DJ, Ewan PW, Lomas DA. The effect of sequence variations within the coding region of the C1 inhibitor gene on disease expression and protein function in families with hereditary angio-oedema. *J Med Genet* 2003; 40: e114.
174. Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin-converting enzyme insertion / deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation* 2000; 22: 102.
175. Freiburger T, **Grombirkova** H., Ravcukova B., Jarkovsky J., **Kuklinek** P., Krystufkova O., **Hanzlikova** J., Dankova E., Kopecky O., Zachova R., Lahodna M., Vasakova M., Grodecka L., Litzman J. No Evidence for Linkage between the Hereditary Angiooedema Clinical Phenotype and the BDKR1, BDKR2, ACE or MBL2 gene . *Scandinavian Journal of Immunology*, 2011, 74, 100-106