



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας

Διευθυντής: Καθηγητής Αναστάσιος Ε. Γερμενής



Διδακτορική Διατριβή

**"ΤΟ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ
ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΟΔΟΥ
ΒΡΑΔΥΚΙΝΙΝΗΣ-ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ"**

υπό

ΝΙΚΟΛΑΟΥ Α. ΚΟΥΤΣΟΣΤΑΘΗ

Αλλεργιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων

για την απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2015

Copyright © 2015 Νικόλαος Α. Κουτσοστάθης

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της διατριβής για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

- 1^{ος} Εξεταστής**
(Επιβλέπων) Δρ. **Ματθαίος Σπελέτας**
Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. **Αναστάσιος Γερμενής**
Καθηγητής Ανοσολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. **Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**
Καθηγητής Πνευμονολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. **Γεώργιος Νταλέκος**
Καθηγητής Παθολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. **Λάζαρος Σακκάς**
Καθηγητής Παθολογίας- Ρευματολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. **Ευθυμία Πετεινάκη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. **Χαράλαμπος Σκουλάκης**
Επίκουρος Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ο σωστός δρόμος είναι ο ανήφορος

Νίκος Καζαντζάκης (1883-1957)

Στα παιδιά μου, Αναστάση και Αθανασία και στη σύζυγο μου Χριστίνα

**"ΤΟ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ
ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΟΔΟΥ
ΒΡΑΔΥΚΙΝΙΝΗΣ-ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ"**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Α. ΚΟΥΤΣΟΣΤΑΘΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ματθαίος Σπελέτας**, Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**),
2. **Δρ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής**, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**, Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες.....	10
Βιογραφικό σημείωμα	13
Δημοσιευμένες μελέτες της διατριβής.....	19
Συνομογραφίες.....	21
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ.....	24
2. ΤΟ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ - ΚΑΟ (Hereditary Angioedema – HAE).....	26
2.1 Επιδημιολογία.....	26
2.2 Γενετική βλάβη.....	26
2.3 Η παθοφυσιολογία του ΚΑΟ και ο ρόλος του αναστολέα του C1 κλάσματος του συμπληρώματος.....	28
2.4 Κλινική εικόνα	33
2.5 Κλινική βαρύτητα και συσχέτιση με τροποποιητικούς παράγοντες	37
2.6 Η διάγνωση του ΚΑΟ	37
2.7 Η θεραπεία του ΚΑΟ	39
2.8 Ποιότητα της ζωής των ασθενών στο ΚΑΟ.....	44
2.9 Ειδικές μορφές αγγειοοιδήματος χωρίς κνίδωση.....	44
3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ - ΚΙΝΙΝΩΝ	51
3.1 Παράγοντας Hageman (Factor XII- FXII).....	52
3.1.1 Ενεργοποίηση του συστήματος επαφής.....	56
3.1.2 Ο πολυμορφισμός C46T (rs1801020) του <i>F12</i>	59
3.1.3 Κλινικές συσχετίσεις του πολυμορφισμού C46T (rs1801020) του <i>F12</i>	60
3.2 Καλλικρεΐνη πλάσματος (KL).....	61
3.3 Κινογόνα (Παραγωγή κινινών)	62
3.4 Κινίνες και υποδοχείς της βραδυκινίνης (BK).....	63
3.4.1 Ο πολυμορφισμός -699G>C (rs4905475) του <i>BDKRB1</i> και κλινικές συσχετίσεις του 68	
3.5 Καταβολισμός της βραδυκινίνης	69
3.5.1 Μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης (ACE)	69
3.5.2 Ο πολυμορφισμός I/D του ACE (<i>rs1799752</i>).....	72
3.5.2 Κλινικές συσχετίσεις του I/D πολυμορφισμού (<i>rs1799752</i>) του ACE.....	75
3.5.2 Υπόλοιπα ένζυμα του καταβολισμού της βραδυκινίνης	78
Ο C1-INH και ο πολυμορφισμός V480M (<i>rs4926</i>) στο <i>SERPING1</i> και κλινικές συσχετίσεις του ..	80
4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΤΟΥ ΚΑΟ.....	81

4.1 Φαινότυπος του ΚΑΟ και οι πολυμορφισμοί <i>BDKRB1</i> (<i>rs4905475</i>), <i>F12</i> (<i>rs1801020</i>), <i>ACE I/D</i> (<i>rs1799752</i>), <i>SERPING1</i> (<i>rs4926</i>) της μελέτης	81
4.2 Φαινότυπος του ΚΑΟ και άλλοι γενετικοί παράγοντες	81
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ.....	83
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	85
1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	86
1.1 Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες	86
1.2 Μεθοδολογία	88
1.2.1 Συγκέντρωση κλινικών – θεραπευτικών – εργαστηριακών δεδομένων.....	88
1.2.2 Μοριακή μελέτη για την ανίχνευση των υπό μελέτη πολυμορφισμών (PCR-RFLP Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms).....	90
1.3 Στατιστική ανάλυση.....	106
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	107
2.1. Το ΚΑΟ στην Ελλάδα	107
2.1.1 Η συχνότητα του ΚΑΟ στην Ελλάδα	107
2.1.2 Γεωγραφική κατανομή των γνωστών με ΚΑΟ ασθενών στην Ελλάδα.....	107
2.2 Κλινικά - εργαστηριακά - θεραπευτικά δεδομένα των ασθενών της μελέτης.....	108
2.2.1 Φύλο και ηλικία ασθενών	109
2.2.2 Τύπος κληρονομικού αγγειοιδήματος	109
2.2.3 Ηλικία έναρξης του ΚΑΟ και θέση της πρώτης προσβολής.....	110
2.2.4 Καθυστέρηση στη διάγνωση του ΚΑΟ	111
2.2.5 Συχνότητα προσβολής των διαφόρων οργάνων και διάρκεια των κρίσεων ΑΟ	111
2.2.6 Επιπλοκές της νόσου (τραχειοτομία, εσφαλμένα χειρουργεία, θάνατοι)	112
2.2.7 Εκλυτικά αίτια κρίσεων ΚΑΟ και πρόδρομα συμπτώματα	113
2.2.8 Βαρύτητα της νόσου.....	114
2.2.9 Ορμονικές μεταβολές και κρίσεις ΚΑΟ στις γυναίκες.....	115
2.2.10 Εργαστηριακά ευρήματα της νόσου - Τιμές C4 και C1INH (ποσοτικός και λειτουργικός).....	116
2.2.11 Θεραπευτικά δεδομένα της νόσου στην Ελλάδα	116
2.2.12 Επίδραση του ΚΑΟ σε πτυχές της ζωής των ασθενών	119
2.3 Συχνότητα των μελετώμενων πολυμορφισμών των ενζύμων κινινών- καλλικρεΐνης ...	121
2.3.1 Πολυμορφισμός <i>BDKRB1</i> -(-699G>C) (<i>rs4905475</i>)	121
2.3.2 Πολυμορφισμός <i>F12</i> - 5046T>C (<i>rs1801020</i>), <i>F12</i> -C46T.....	123
2.3.3 Πολυμορφισμός <i>ACE I/D</i> (<i>rs1799752</i>).....	124
2.3.4 Πολυμορφισμός <i>SERPING1</i> -21963G>A (<i>V480M</i> , <i>rs4926</i>)	126
2.4 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ΚΑΟ και πολυμορφισμοί των γονιδίων της οδού κινινών-καλλικρεΐνης	128

2.4.1	Ηλικία έναρξης του ΚΑΟ	128
2.4.2	Κρίσεις ΚΑΟ στον λάρυγγα.....	131
2.4.3	Κρίσεις ΚΑΟ στο πεπτικό σύστημα	131
2.4.4	Μακροχρόνια θεραπεία με ανδρογόνα.....	133
3.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	134
	Περίληψη - Abstract	143
	Βιβλιογραφία	147
	Παράρτημα Ι.....	169

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν οι ασθενείς με κληρονομικό αγγειοίδημα από κέντρα και νοσοκομεία από όλη την Ελλάδα καθώς και φυσιολογικοί δότες περιφερικού αίματος από την βάση δειγμάτων του εργαστηρίου Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας.

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική διατριβή μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της Τριμελούς επιτροπής παρακολούθησης. Αρχικά εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας κ. Ματθαίο Σπελέτα, επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής μου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το κληρονομικό αγγειοίδημα, μια σπάνια πάθηση με τόσο ενδιαφέρον και τη συμπαράσταση, υπομονή, επίβλεψη και καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα. Οι συμβουλές του στάθηκαν πολύτιμες, με ενέπνευσαν και με οδήγησαν στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ολόψυχες και θερμές ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας κ Αναστάσιο Ε. Γερμενή που με δέχθηκε στο εργαστήριό του και μου έδωσε αυτή την ευκαιρία. Ακόμη θέλω να τον ευχαριστήσω για τη βοήθεια, την υποστήριξη, την κριτική σκέψη και την κατανόησή του σε θέματα και δυσκολίες σε όλη διαδρομή της μελέτης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Πνευμονολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τον κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Παθολογίας κ. Γεώργιο Νταλέκο, τον Καθηγητή Παθολογίας- Ρευματολογίας κ. Λάζαρο Σακκά, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Ευθυμία Πετεινάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή Ωτορινολαρυγγολογίας κ. Χαράλαμπο Σκουλάκη.

Ένα σημαντικό τμήμα της ερευνητικής δουλειάς αφορούσε την εργαστηριακή μελέτη και ανάλυση των δειγμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την διαρκή υποστήριξη, τον προσωπικό χρόνο και κόπο τους στην εργαστηριακή ανάλυση την κ. Εύα Κουβατά, την κ. Χριστίνα Χατεδάκη, την κ. Εύα Γραμμουσιανού για την σημαντική βοήθεια και συνεργασία

της, την κ. Αντιγόνη Αβραμούλη για την αμέριστη βοήθεια και τις γνώσεις της σε κάθε βήμα και την κ. Ευαγγελία Καραμούτη. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Κομπότη για την στατιστική ανάλυση και εγκυρότητα των στοιχείων της διατριβής. Επίσης να ευχαριστήσω τη Γεθσημανή Καραϊσκού και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Λόγω της σπανιότητας του νοσήματος η έρευνα της παρούσας διατριβής δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς τη συνεργασία και τη βοήθεια πολλών ανθρώπων κατά τη συλλογή κλινικών στοιχείων και εργαστηριακών δειγμάτων. Αρχικά από το Αλλεργιολογικό τμήμα του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων τον πραγματικό φίλο μου κ. Φώτη Ψαρρό για την διαρκή υποστήριξή του και την αρμονική συνεργασία μας κάτω από δύσκολες συνθήκες. Ιδιαίτερα ευχαριστώ από τις Παιδιατρικές κλινικές του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης τις κ. Έφη Παπαδοπούλου-Αλατάκη και την κ. Ευαγγελία Φαρμάκη για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή τους, από την Ωτορινολαρυγγολογική κλινική του Βοστανείου Νοσοκομείου Μυτιλήνης τους κ. Χριστόφορο Θεοδώρου και κ. Γιώργο Στούμπο. Επίσης θα ήθελα να σταθώ ιδιαίτερα στον πρώην διευθυντή μου στο Αλλεργιολογικό τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό», τον κ. Βασίλειο Βοβόλη τόσο για την απεριόριστη και καταλυτική βοήθεια του στην εκκίνηση της διατριβής όσο και την εύστοχη καθοδήγησή και την έμπρακτη υποστήριξή του στη συνέχειά της, όπως επίσης από το αλλεργιολογικό τμήμα του «Λαϊκού» την κ. Ευαγγελία Κομπότη για την ένθερμη και τη σημαντική βοήθεια της, τον κ. Νικόλαο Μήκο και ιδιαίτερα την κ. Θάλεια Στεφανάκη και τον κ. Λάμπρο Καλόγηρο για την σημαντική βοήθειά και πραγματική συνεισφορά τους στη συλλογή των στοιχείων των ασθενών. Επίσης να ευχαριστήσω από την Παιδοαλλεργιολογική Πανεπιστημιακή μονάδα στο Παιδιατρικό Νοσοκομείο «Αγλαΐα Κυριακού» τον διευθυντή κ. Μανώλη Μανουσάκη για τη συμμετοχή του.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα όλους τους ασθενείς με κληρονομικό αγγειοίδημα για τη συμμετοχή τους. Μέσα από τη γνωριμία και τη πολύωρη συζήτηση μαζί τους με βοήθησαν να δω από την οπτική τους γωνία πολλά πράγματα, να καταλάβω πόσο υποφέρουν, πόσο αγωνιούν και να αναλογιστώ πόσα σημαντικά πράγματα μένουν να γίνουν στη Ελλάδα για το κληρονομικό αγγειοίδημα, αλλά και στις σπάνιες παθήσεις

γενικότερα. Τέλος τη γυναίκα μου Χριστίνα για τη υποστήριξη και την κατανόηση της, τα παιδιά μου Αθανασία και Αναστάση για την σημαντική δύναμη που μου έδιναν, και του γονείς μου Ανέστη και Μαρία για την συμπαράστασή τους όλο αυτό το διάστημα.

Βιογραφικό σημείωμα

Όνοματεπώνυμο: Νικόλαος Α. Κουτσοστάθης

Ημερομηνία Γέννησης: 25 Σεπτεμβρίου 1969

Τόπος γέννησης: Αθήνα

Διεύθυνση: Αριστοφάνη 31, Γέρακας 15344

Τηλέφωνο: 211401457

Φαξ: 211 7707494

Κινητό: 6974105353

E-mail: kounikos@gmail.com **Website:** www.allergic.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ -- ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 4/2000** Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών. Βαθμός πτυχίου : Λίαν Καλώς. (7,4)
- 11/2009** Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Αλλεργιολογίας.
Πλήρης Υποτροφία στο Αμερικανικό Κολλέγιο Θεσσαλονίκης «ΑΝΑΤΟΛΙΑ» στις τάξεις Γυμνασίου – Λυκείου.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 4/2002 – 7/2003** Τρίμηνη εκπαίδευση στο Γενικό Νοσοκομείο Καρδίτσας και υπηρεσία υπαίθρου στο Αγροτικό Ιατρείο Ρεντίνας του Κ.Υ. Σοφάδων.
- 5/2004 – 2/2006** Ειδικευόμενος Παιδιατρικής στην Παιδιατρική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ασκληπιείο Βούλας».
- 10/2006 - 2/2010** Ειδικευόμενος Αλλεργιολογίας στο Αλλεργιολογικό Τμήμα στο «Λαϊκό» Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών.
- 6/2010-** Αλλεργιολόγος και υπεύθυνος αλλεργιολογικού ιατρείου στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ερρίκος Ντυνάν».
- 2/2010-** Ιδιωτικό ιατρείο στην περιοχή της Παλλήνης, Αττική.
- 12/2011 -** Επιστημονικός συνεργάτης, «Αθηναϊκής Κλινική».

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- 2010-** Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (ΕΑΑΚΑ).
- 2010-** Μέλος της Ευρωπαϊκής Ακαδημίας Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (ΕΑΑΚΙ).
- 2012-** Μέλος της Επιστημονικής Εταιρείας Σπάνιων Παθήσεων και Ορφανών Φαρμάκων (Ε.Ε.Σ.Π.Ο.Φ.).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Dose-dependent anaphylaxis to orange juice without detectable specific immunoglobulin E. Vovolis V, **Koutsostathis N.**, J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19(6):508-9
2. Severe immunoglobulin E-mediated anaphylaxis to intravenous methylprednisolone succinate in a patient who tolerated oral methylprednisolone. **Koutsostathis N**, Vovolis V., J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19(4):330-2. PMID: 19639737
3. IgE-mediated allergy to raw cabbage but not to cooked. Vovolis V, Poullos G, **Koutsostathis N.**, Allergy. 2009 Jun;64(6):964-5. Epub 2009 Feb 17. PMID: 19222418
4. IgE-mediated anaphylaxis to proton pump inhibitors - cross-reacting study. Vovolis V, **Koutsostathis N**, Stefanaki E., Allergy. 2008 Sep;63(9):1251-2.
5. Anaphylactic reaction to omeprazole. Stefanaki EC, Vovolis V, Letsa I, **Koutsostathis N.**, Am J Gastroenterol. 2008 Jun;103(6):1581-3. PMID: 18510599
6. Successful venom immunotherapy to paper wasp, in IgE-venom negative patient. Vovolis V, Mikos N, **Koutsostathis N.** Allergol Immunopathol (Madr). 2010 Jul 22.
7. Garlic-Induced Severe Anaphylaxis in a Nonatopic Patient V Vovolis, L Kalogiros, D Ivanova, **N Koutsostathis**, J Investig Allergol Clin Immunol., 2010;20(4):360-1.
8. Immunoglobulin E–Mediated Anaphylaxis to Rabeprazole V Vovolis, K Christogianni, **N Koutsostathis** J Investig Allergol Clin Immunol., J Investig Allergol Clin Immunol. 2010;20(4):356.
9. Hereditary Angioedema in Greece: The First Results of the Greek Hereditary Angioedema Registry. Psarros F, **Koutsostathis N**, Farmaki E, Speletas MG, Germenis AE. Int Arch Allergy Immunol. 2014 Sep 23;164(4):326-332
10. F12-46C/T polymorphism as modifier of the clinical phenotype of hereditary angioedema. M. Speletas, A. Szilagyi, D. Csuka, **N. Koutsostathis**, F. Psarros, D. Moldovan, M. Magerl, M. Kompoti, L. Varga, M. Maurer, H. Farkas, A.E. Germenis Allergy 2015; 70: 1661–1664

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

- 2010** Β΄ Βραβείο 8^{ου} Πανελληνίου Αλλεργιολογικού Συνεδρίου για την ανακοίνωση: Αλλεργία με IgE μηχανισμό στο ωμό και όχι στο βρασμένο λάχανο. Διερεύνηση ευαισθητοποίησης σε άλλα συγγενή λαχανικά και φρούτα. Γ. Πούλιος, Β. Βοβόλης, **N. Κουτσοστάθης**, Χ. Πιπέρη, Α. Γαργαλιώνης, Α. Παπαχρόνη, Χ. Αδαμόπουλος
- 2010** Γ΄ Βραβείο 8^{ου} Πανελληνίου Αλλεργιολογικού Συνεδρίου για την ανακοίνωση: Αυτοχορηγούμενη αδρεναλίνη στα υμενόπτερα. Ανακύπτουν προβλήματα; **N. Κουτσοστάθης**, Β. Βοβόλης, Γ. Πούλιος, Ε. Σιφναίος
- 2010** Έπαινος για καλύτερη ανακοίνωση στο τμήμα αναρτημένων ανακοινώσεων στο Drug-allergy session 29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology με τίτλο IgE- mediated anaphylaxis exclusively to rabeprazole, Vovolis V; Christogianni K; **Koutsostathis N**

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Αλλεργία με IgE μηχανισμό στο ωμό και όχι στο βρασμένο λάχανο. Διερεύνηση ευαισθητοποίησης σε άλλα συγγενή λαχανικά και φρούτα. Γ.Πούλιος, Β.Βοβόλης, **N.Κουτσοστάθης**, Χ.Πιπέρη, Α. Γαργαλιώνης, Α. Παπαχρόνη, Χ.Αδαμόπουλος, Ελληνική Αλλεργιολογία & Κλινική Ανοσολογία, 2010; 3 (2-3): 98

2. IgE- μεσολαβούμενη σοβαρή αναφυλακτική αντίδραση μετά από βρώση σκόρδου (*Allium sativum*), Β.Βοβόλης, Λ.Καλόγηρος, Ν. Ιβάνοβα, **Ν.Κουτσοστάθης**, Ελληνική Αλλεργιολογία & Κλινική Ανοσολογία, 2011; 4 (1-2): 53
3. Κατευθυντήριες οδηγίες ανοσοθεραπείας – Guidelines for Allergen immunotherapy – Ομάδα Ανοσοθεραπείας ΕΑΑΚΑ. Δ.Βούρδας, Κ.Κανάκη, **Ν.Κουτσοστάθης**, Ι.Παρασκευόπουλος, Κ.Παταλάς, Λ.Πίτσιος, Ε.Σιφναίος, Α.Χλίβα, 2012; 4 (2-3): 63

ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ – ΗΜΕΡΙΔΕΣ – ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΕΣ - ΠΡΟΕΔΡΕΙΑ

- 4.2011** “Η σημασία της ηωσινοφιλικής φλεγμονής στη στοχευμένη αγωγή του άσθματος” στην ημερίδα “Η ειδική αντιμετώπιση της αλλεργικής φλεγμονής”,. Αλλεργιολογικό τμήμα Πανεπιστημιακής κλινικής του νοσοκομείου Παίδων “Αγλαΐα Κυριακού” ,Λουτράκι.
- 2.2012** «Κληρονομικό αγγειοίδημα. Η προσπάθεια καταγραφής στην Ελλάδα και τα πρώτα αποτελέσματα», Μαθήματα Ελληνικής Αλλεργιολογικής εταιρείας (Ε.Α.Α.Κ.Α).
- 10.2012** «Κληρονομικό αγγειοίδημα» στην επιστημονική ημερίδα « Σπάνιες παθήσεις & ορφανά φάρμακα στην καθημερινή κλινική πράξη» από την Επιστημονική Εταιρεία Σπανίων παθήσεων και Ορφανών Φαρμάκων (Ε.Ε.Σ.Π.Ο.Φ.), Λάρισα.
- 10.2012** «Καταγραφή περιστατικών ΚΑΟ – Η Ελληνική εμπειρία», στο 9^ο Πανελλήνιο Αλλεργιολογικό Συνέδριο , Αθήνα.
- 12.2012** «Καταγραφές από ερευνητικές ομάδες, πανεπιστήμια, νοσοκομεία, ερευνητικά ινστιτούτα» στην εκδήλωση «Εθνικό σχέδιο δράσης για τις σπάνιες παθήσεις», Ευγενίδειο ίδρυμα, Αθήνα.
- 3.2013** «Κληρονομικό αγγειοίδημα» στην επιστημονική ημερίδα « Σπάνιες παθήσεις & ορφανά φάρμακα στην καθημερινή κλινική πράξη» από την Ε.Ε.Σ.Π.Ο.Φ., Αλεξανδρούπολη.
- 4.2013** «Το κληρονομικό αγγειοίδημα στην Ελλάδα» στο 43^ο Συμπόσιο της Παιδιατρικής Εταιρείας Βορείου Ελλάδος στην Θεσσαλονίκη
- 11.2013** «Διαγνωστική προσπέλαση του ασθενούς με αγγειοίδημα» στις 7^{ες} Αλλεργιολογικές εξελίξεις, Καλαμπάκα.
- 12.2013** «Κληρονομικό αγγειοίδημα» στην επιστημονική ημερίδα « Σπάνιες παθήσεις & ορφανά φάρμακα στην καθημερινή κλινική πράξη» από την Ε.Ε.Σ.Π.Ο.Φ.,Αγρίνιο.
- 1.2014** Συμβουλευτικές υπηρεσίες ειδικών στη Novartis – expert panel - για τη χρόνια κνίδωση και την ομαλιζουμάμπη.
- 3.2014** «Οίδημα Δέρματος και Λάρυγγα: Μήπως Κληρονομικό Αγγειοίδημα » Ομιλητής στην επιστημονική ημερίδα « Σπάνιες παθήσεις & ορφανά φάρμακα στην καθημερινή κλινική πράξη» από την Ε.Ε.Σ.Π.Ο.Φ, Ναύπλιο.
- 5.2014** «Κληρονομικό αγγειοίδημα» στην επιστημονική ημερίδα « Σπάνιες παθήσεις & ορφανά φάρμακα στην καθημερινή κλινική πράξη» από την Ε.Ε.Σ.Π.Ο.Φ., Πάτρα.
- 6.2014** «Νυγμοί από υμενόπτερα». στην επιστημονική ημερίδα « Καλοκαίρι και υγεία» από την Επιστημονική Εταιρεία Ταξιδιωτικής Ιατρικής, Αθήνα.
- 10.2014** «Κληρονομικό αγγειοίδημα» στην επιστημονική ημερίδα « Σπάνιες παθήσεις & ορφανά φάρμακα στην καθημερινή κλινική πράξη» από την Ε.Ε.Σ.Π.Ο.Φ., Μυτιλήνη.

- 10.2014** Πρόεδρος στην ενότητα «Difficult cases – Δύσκολες παθήσεις», στο 10^ο Πανελλήνιο Αλλεργιολογικό Συνέδριο, Αθήνα.
- 12.2014** «Η παθοφυσιολογία της χρόνιας κνίδωσης» σε επιμορφωτική ημερίδα από την εταιρεία Galenica, Πορταριά.
- 4.2015** «Κληρονομικό αγγειοοίδημα» στην επιστημονική ημερίδα « Σπάνιες παθήσεις & ορφανά φάρμακα στην καθημερινή κλινική πράξη» από την Ε.Ε.Σ.Π.Ο.Φ., Τρίπολη.
- 5.2015** «Κληρονομικό αγγειοοίδημα» στην επιστημονική ημερίδα « Σπάνιες παθήσεις & ορφανά φάρμακα στην καθημερινή κλινική πράξη» από την Ε.Ε.Σ.Π.Ο.Φ., Κέρκυρα.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. IgE-mediated Allergy to raw cabbage but not to cooked. Cross-reactivity clinical study. Vovolis V. , Poulios G. , **Koutsostathis N.** , Mikos N., Lambrinidou G Poster presentation, 27th Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology , Barcelona, Spain, June 2008.
2. Two cases with IgE mediated anaphylaxis to Proton Pump Inhibitors (PPIs) - Cross-reacting study among PPIs. Vovolis V. , **Koutsostathis N.** ,Stefanaki E., Marsoni I., Keratsas S. Poster presentation, 27th Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology , Barcelona, Spain, June 2008.
3. IgE mediated anaphylaxis to succinate methylprednisolone – Cross reactivity only to succinate hydrocortisone. **Koutsostathis N.** , Vovolis V. Poulios G., Ivanova D., Kouri M. Poster presentation, 27th Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology , Barcelona, Spain, June 2008.
4. Correlation between autologous serum skin test (ASST) positivity and the severity of symptoms of chronic autoimmune urticarial Vovolis V. Ivanova D.,Mikos N., **Koutsostathis N.**, Poulios G. Poster presentation, 27th Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology , Barcelona, Spain, June 2008.
5. Factors associated to proper technique and carrying compliance with self-injectable adrenaline in insect venom allergic patients and its effect on patients' quality of life. **Koutsostathis N.** , Vovolis V. Poulios G., Sifnaios M. , Keratsas S., Mikos N. Oral abstract session, 28th Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology , Warszawa, Poland, June 2008.
6. Anaphylaxis to orange without detectable specific IgE revealed only by challenge test. Vovolis V. , **Koutsostathis N.** , Poulios G., Sifnaios M. , Marsoni I. , Lambrinidou G. Poster presentation, 28th Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology , Warszawa, Poland, June 2008.
7. Successful venom immunotherapy to paper wasp venom in a IgE-negative patient. Mikos N., Keratsas S, Kouri M. , **Koutsostathis N.** , Sifnaios E., Vovolis V. Oral abstract session, 28th Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology , Warszawa, Poland, June 2008.
8. Contact dermatitis to topical (nasal) corticosteroids Ivanova D., Vovolis V., Sifnaios E., **Koutsostathis N.** , Mikos N., Poulios G. Poster discussion session, 28th Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology , Warszawa, Poland, June 2008.

9. Proper administration of self- injectable adrenaline to venom allergic patients **Koutsostathis N.**,Vovolis V. Poster presentation, 21th World Allergy Congress , Buenos Aires, Argentina, December 2009.
10. Association between ASST positivity and autoimmune urticaria activity Diana, I; Lambrinidou, G; Vovolis, V; Sifnaios, E; **Koutsostathis, N**; Keratsas, S Poster 1166, 29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, London , June 2010.
11. Anaphylaxis due to pomegranate seed ingestion Tsoumani, M; Kalogiros, L; Keratsas, S; Vovolis, V; **Koutsostathis, N** Poster 1584, 29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, London , June 2010
12. Garlic (Allium Sativum) - induced severe anaphylaxis in a non-atopic patient Kalogiros, L; Vovolis, V; Ivanova, D; **Koutsostathis, N** Poster 1585 , 29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, London , June 2010.
13. IgE- mediated anaphylaxis exclusively to rabeprazole Vovolis, V; Christogianni, K; **Koutsostathis, N** Poster 1670 , 29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, London , June 2010.
14. Hereditary Angioedema in Greece. FE Psarros, M Speletas, **N Koutsostathis**, Anastasios E Germenis, , Hereditary Angioedema Workshop Meeting, Cappadokia, Turkey 09/2013.
15. The F12-46C/T polymorphism predicts the age of disease onset in patients with hereditary angioedema due to C1-INH deficiency (C1-INH-HAE) Speletas M, Szilagyi A, **Koutsostathis N**, Psarros F, Moldovan D, Magerl M, Kompoti M, Varga L, Maurer M, Farkas H, Germenis AE Budapest , Hungary, May 2015.

ΑΝΑΚΟΝΩΣΕΙΣ ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Αλλεργία με IgE μηχανισμό στο ωμό και όχι στο βρασμένο λάχανο. Διερεύνηση ευαισθητοποίησης σε άλλα συγγενή λαχανικά και φρούτα. Βοβόλης Β., Πούλιος Γ. , **Κουτσοστάθης Ν.** Προφορικές Ανακοινώσεις , 34^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 2008 Τόμος Περιλήψεων 2008, Volume 25 , Supplement 1, σελ. 18.
2. Παράγοντες που σχετίζονται με τη συμμόρφωση και μεταφορά της αυτοχορηγούμενης αδρεναλίνης σε αλλεργικούς ασθενείς σε υμενόπτερα και επίδραση της στην ποιότητα ζωής. **Κουτσοστάθης Ν.**, Βοβόλης Β., Πούλιος Γ., Σιφναίος Ε. · Κεράτσας Σ. · Μήκος Ν. Προφορικές Ανακοινώσεις , 35^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 2009.
3. Θετική προκλήσεις σε εικονικό φάρμακο σε φαρμακευτική πρόκληση και κρίσεις πανικού στη διερεύνηση της φαρμακευτικής αλλεργίας **Ν. Κουτσοστάθης**, Β. Βοβόλης Ελληνική Αλλεργιολογία & Κλινική Ανοσολογία Περίοδος Β', Τόμος 2, Τεύχος 3, σελ., Προφορικές Ανακοινώσεις , 8ο Πανελλήνιο Αλλεργιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2010.
4. Σοβαρές IgE- μεσολαβούμενες αντιδράσεις σε ενέσιμα κορτικοστεροειδή με ανοχή στα αντίστοιχα εκ του στόματος σκευάσματα **Ν. Κουτσοστάθης**, Γ. Πούλιος, Β. Βοβόλης, Ελληνική Αλλεργιολογία & Κλινική Ανοσολογία, Περίοδος Β', Τόμος 2, Τεύχος 3, σελ. Προφορικές Ανακοινώσεις , 8^ο Πανελλήνιο Αλλεργιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2010.

5. Αυτοχορηγούμενη αδρεναλίνη στην αλλεργία σε υμενόπτερα. Ανακύπτουν προβλήματα; **N. Κουτσοστάθης**, Β. Βοβόλης, Γ. Πούλιος, Ε. Σιφναίος Ελληνική Αλλεργιολογία & Κλινική Ανοσολογία, Περίοδος Β', Τόμος 2, Τεύχος 3, σελ. Προφορικές Ανακοινώσεις , 8^ο Πανελλήνιο Αλλεργιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2010.
6. Αλλεργία με IgE μηχανισμό στο ωμό και όχι στο βρασμένο λάχανο. Διερεύνηση ευαισθητοποίησης σε αλλά συγγενή λαχανικά και φρούτα. Γ. Πούλιος, Β. Βοβόλης, **N. Κουτσοστάθης**, Χ. Πιτέρη, Α. Γαργαλιώνης, Α. Παπαχρόνη, Χ. Αδαμόπουλος Ελληνική Αλλεργιολογία & Κλινική Ανοσολογία, Περίοδος Β', Τόμος 2, Τεύχος 3, σελ. Προφορικές Ανακοινώσεις , 8^ο Πανελλήνιο Αλλεργιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2010.
7. Σοβαρές αναφυλακτικές αντιδράσεις σε μη ατοπικό ασθενή μετά από βρώση σκόρδου. Λ. Καλόγηρος, Β. Βοβόλης, Ν. Ιβάνοβα, **N. Κουτσοστάθης** Ελληνική Αλλεργιολογία & Κλινική Ανοσολογία, Περίοδος Β', Τόμος 2, Τεύχος 3, σελ. Προφορικές Ανακοινώσεις , 8^ο Πανελλήνιο Αλλεργιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2010.
8. Αναφυλαξία στη ραμπεπραζόλη με IgE μηχανισμό. *Κ. Χριστογιάννη*, **N. Κουτσοστάθης**, Β. Βοβόλης Ελληνική Αλλεργιολογία & Κλινική Ανοσολογία, Περίοδος Β', Τόμος 2, Τεύχος 3, σελ. Προφορικές Ανακοινώσεις , 8^ο Πανελλήνιο Αλλεργιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 201.
9. Ο συμπτωματικός δερμογραφισμός δίνει ψευδώς θετικές δερματικές δοκιμασίες. Ένας μύθος που παραπλανά; Ελεύθερες ανακοινώσεις, 9^ο Πανελλήνιο Αλλεργιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2012 Αικ. Μπρίνια, Ολ. Τσαρουχά, Β. Βοβόλης, **N. Κουτσοστάθης**, Γ. Γιαννάκης.

ΑΛΛΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ -ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- Συμμετοχή σε 12 διεθνή συνέδρια και 31 Ελληνικά συνέδρια
- Γνώσεις Η/Υ
- Γνώσεις στατιστικής ανάλυσης “ Συγκέντρωση, στατιστική ανάλυση και αξιοποίηση δεδομένων με χρήση στατιστικών πακέτων», 30 εκπαιδευτικές ώρες, Εκπαιδευτικό πρόγραμμα ΟΑΕΔ , Πιστοποιητικό Expert Level, Ιούνιος 2005
- Αγγλικά : First Certificate in English (University of Cambridge) - Απόφοιτος Αμερικανικού Κολλεγίου «Ανατόλια» Θεσσαλονίκης
- Μαραθωνοδρόμος

1. Hereditary angioedema in Greece: the first results of the Greek hereditary angioedema registry. *Psarros F, Koutsostathis N, Farmaki E, Speletas MG, Germenis AE. Int Arch Allergy Immunol. 2014;164(4):326-32. doi: 10.1159/000366276. Epub 2014 Sep 23.*

ABSTRACT

OBJECTIVE To present the preliminary results from the patients recorded into the Greek Hereditary Angioedema Registry (GHAER) over the last three years (July 2010 – June 2013).

MATERIALS-METHOD AND RESULTS A systematic recording of hereditary angioedema (HAE) cases was undertaken following a physician awareness campaign and confirmation of diagnosis. A questionnaire was also used for the assessment of key parameters of disease-specific patient quality of life. 116 patients from 41 non-related families were recorded. There were 33 (80.5%) families with type I HAE, 7 (17%) with type II HAE and one (2.5%) with non-C1-Inh, non-FXII HAE, of which two further sporadic cases were recorded. Analyses performed on non-symptomatic family members revealed another 6 asymptomatic individuals with deficiency of C1-esterase inhibitor. By extrapolation of the determined frequency to the entire country population, the prevalence of HAE in Greece is estimated at approximately 1/90,000. The average delay in diagnosis was 16.5 years (range 0-58 years). 14% of the patients had been subjected to tracheal intubation or cricothyrotomy, while 22% had been subjected to unnecessary surgery. The incidence of deaths in families of patients was 1 for every 2 families. The use of newer therapeutic agents seems to fall significantly short of the existing needs, since 9% of patients reported that they do not even have access to them. By using the 10-point visual analogue scale it was found that HAE affects the quality of life slightly in 14%, greatly in 63% and significantly in 23% of patients; a large proportion of affirmative responses to the questions referring to the disease-specific quality life was recorded.

CONCLUSIONS In Greece there was a significant degree of underdiagnosis of HAE, which seems to be reversed dramatically over the past three years. The epidemiological and

clinical characteristics of the disease in our country do not differ from those reported worldwide. However, we found very low compliance, by all involved parties, with the provisions of the applicable international guidelines and consensus positions, with adverse consequences on the patients' quality of life.

2. F12-46C/T polymorphism as modifier of the clinical phenotype of hereditary angioedema. M. Speletas, A. Szilagyi, D. Csuka, N. Koutsostathis, F. Psarros, D. Moldovan, M. Magerl, M. Kompoti, L. Varga, M. Maurer, H. Farkas, A.E. Germenis. *Allergy* 2015; 70: 1661–1664

Abstract

The factors influencing the heterogeneous clinical manifestation of hereditary angioedema due to C1-INH deficiency (C1-INH-HAE) represent one of the oldest unsolved problems of the disease. Considering that factor XII (FXII) levels may affect bradykinin production, we investigated the contribution of the functional promoter polymorphism *F12-46C/T* in disease phenotype. We studied 258 C1-INH-HAE patients from 113 European families and we explored possible associations of *F12-46C/T* with clinical features and the *SERPING1* mutational status. Given that our cohort consisted of related subjects, we implemented generalized estimating equations (GEE), an extension of the generalized linear model accounting for the within-subject correlation. *F12-46C/T* carriers exhibited a significantly delayed disease onset ($p < 0.001$) and did not need long-term treatment ($p = 0.02$). In a GEE linear regression model the presence of *F12-46C/T* was significantly associated with a 7-year delay in disease onset ($p < 0.0001$) regardless of *SERPING1* mutational status. It is concluded that *F12-46C/T* carriage acts as an independent modifier of C1-INH-HAE severity.

AAE - EAO (Acquired angioedema)	Επίκτητο Αγγειοοίδημα
ACE (Angiotensin-converting enzyme)	Αναστολέας του μετατρεπτικού ενζύμου ή κινινάση II
ACEi (Angiotensin I-converting enzyme inhibitors)	Οι ανταγωνιστές του μετατρεπτικού ενζύμου
AE-ACEi (Angioedema induced from angiotensin I-converting enzyme inhibitors)	Αγγειοοίδημα από αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου
AO (Angioedema)	Αγγειοοίδημα
APP (Aminopeptidase P)	Αμινοπεπτιδάση P
aPTT (Activated partial thromboplastin time)	Ενεργοποιημένος χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης
B1R - BDKRB1 (B1 receptor)	Υποδοχέας βραδυκινίνης B1
B2R - BDKRB2 (B2 receptor)	Υποδοχέας βραδυκινίνης B2
BK (Bradykinin)	Βραδυκινίνη
C1-INH (C1 esterase inhibitor)	Αναστολέας της C1 εστεράσης
CK1 Cytokeratin 1)	Κυτταροκερατίνη 1
CPN (Carboxypeptidase N, kininase I)	Καρβοξυπεπτιδάση
CS (Contact system)	Σύστημα επαφής
DPPIV (Dipeptidyl peptidase IV)	Διπεπτιδυλ- πεπτιδάση IV
EGF (Epidermal growth factor)	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
FXII (Factor XII, Factor Hageman)	Παράγοντας XII
FXIIa (Activated FXII)	Ενεργοποιημένος FXII
β-FXIIa (Factor XII fragment)	Τμήμα του παράγοντα XII, HFf
gC1qR (Receptor of the globular head of C1q)	Υποδοχέας της σφαιρικής κεφαλής του μορίου C1q

HAE – KAO (Hereditary angioedema)	Κληρονομικό Αγγειοίδημα
HMWK, HK (High Molecular Weight Kininogen)	Υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο
KD (Kalidin)	Καλιδίνη
KKS (Kinine - Kallikrein system)	Σύστημα κινινών - καλλικρεΐνης
KL (Plasma kallikrein)	Καλλικρεΐνη πλάσματος
LMWK (Low molecular weight kininogen)	Χαμηλού μοριακού βάρους κινινογόνο
NEP (Nepilysin)	Νεπριλυσίνη
pdC1-INH (Plasma derived C1-INH)	Προερχόμενος από πλάσμα αναστολέας της C1 εστεράσης του συμπληρώματος
PCR (Polymerase chain reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PK (Prekallikrein, Fletcher factor)	Προκαλλικρεΐνη
PL (Plasmin)	Πλασμίνη
PRCP (Prolylcarboxypeptidase)	Προλυλκαρβοξυπεπτιδάση
QoL (Quality of life)	Ποιότητα της ζωής
RAS (Renin-angiotensin system)	Σύστημα Ρενίνης- Αγγειοτενσίνης
rhC1-INH (Recombinant C1-INH)	Ανασυνδυασμένος αναστολέας της C1 εστεράσης του συμπληρώματος
SERPING1 (Serpin peptidase inhibitor, clade G member 1, C1 inhibitor)	Αναστολέας των πρωτεασών σερίνης 1
SP (Substance P)	Ουσία P
tPA (Tissue Plasminogen Activator)	Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
TF (Tissue Factor)	Ιστικός παράγοντας
TK (Tissue Kallikrein)	Ιστική καλλικρεΐνη
uPA (Urokinase Plasminogen Activator)	Ενεργοποιητής της ουροκινάσης του πλασμινογόνου
uPAR (Urokinase plasminogen activator receptor)	Υποδοχέας του ενεργοποιητή της ουροκινάσης του πλασμινογόνου

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ

Το αγγειοοίδημα (angioedema, ΑΟ) είναι ένα οίδημα των βαθύτερων στοιβάδων του δέρματος ή σπανιότερα των βλεννογόνων (κυρίως του γαστρεντερικού ή του ανώτερου αναπνευστικού) (Εικόνα 1). Το ΑΟ χαρακτηρίζεται κλινικά από υποτροπιάζοντα και αυτοπεριοριζόμενα επεισόδια, τα οποία εμφανίζονται συνήθως αιφνιδίως και διαρκούν από ώρες ως λίγες ημέρες.



Εικόνα 1. Χαρακτηριστικές εικόνες αγγειοοιδήματος.

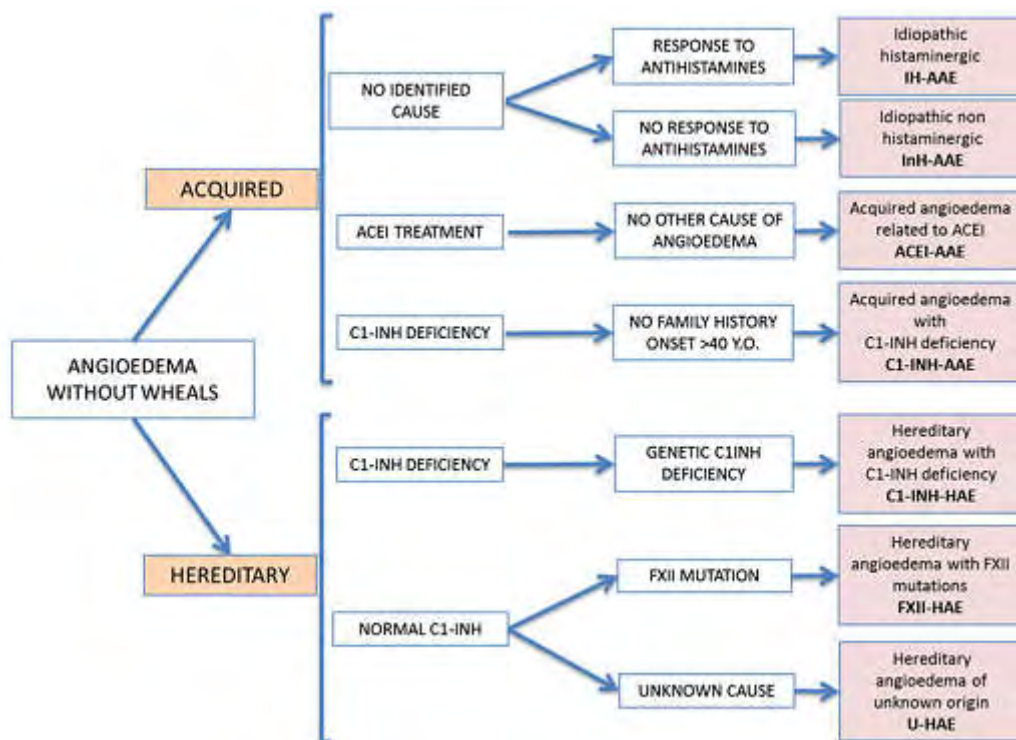
Αγγειοοίδημα στο άνω χείλος (αριστερά) και στο δεξί άνω άκρο (δεξιά) από προσωπικό αρχείο.

Στο δέρμα το ΑΟ είναι σκληρό, δεν αφήνει εντύπωμα στη πίεση, έχει το χρώμα του δέρματος ή είναι ελαφρά ρόδινο, εντοπίζεται συνήθως σε περιοχές με χαλαρό συνδετικό ιστό (π.χ. χείλη, παρειές, γλώσσα, άκρα, γεννητικά όργανα) και δεν είναι κνησμώδες ή επώδυνο. Όταν προσβάλλει το πεπτικό εμφανίζεται με επώδυνες κρίσεις, αλλεπάλληλους εμέτους και διάρροια, ενώ στον λάρυγγα το ΑΟ μπορεί να προκαλέσει μερική απόφραξη με βράγχος φωνής, δυσκαταποσία, δύσπνοια ή ολική απόφραξη με ασφυξία.

Το ΑΟ μπορεί: Α) είτε να συνοδεύεται από κνίδωση, όπως στην αναφυλακτική αντίδραση ή στην χρόνια αυτόματη κνίδωση, Β) είτε να μην συνοδεύεται από κνίδωση, όπως π.χ. στο κληρονομικό αγγειοοίδημα (ΚΑΟ) – hereditary angioedema (HAE). Σύμφωνα με πρόσφατη ταξινόμηση και με βάση το κριτήριο της ύπαρξης ή μη γενετικής βλάβης το τελευταίο ΑΟ χωρίς κνίδωση (Εικόνα 2) διακρίνεται σε :

α) **Κληρονομικό** με την παρουσία ανεπάρκειας (ΚΑΟ τύπου I και II) του αναστολέα της C1 εστεράσης του συμπληρώματος (C1 inhibitor, C1-INH), το οποίο ΚΑΟ και αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής ή κληρονομικό με την *απουσία* ανεπάρκειας του C1-INH (ΚΑΟ με φυσιολογικό C1-INH, παλιότερα ονομαζόμενο ΚΑΟ τύπου III)

β) **Επίκτητο**, το οποίο μπορεί να οφείλεται: σε λήψη του αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου (angiotensin-converting enzyme, ACE), σε επίκτητη ανεπάρκεια του C1-INH λόγω συνήθως λεμφοϋπερπλαστικών ή αυτοάνοσων νοσημάτων και τέλος να χαρακτηρίζεται ιδιοπαθές, όταν δεν αναγνωρίζεται αιτία (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Πρόσφατη ταξινόμηση του ΑΟ χωρίς πομφούς από Cicardi et al. ¹

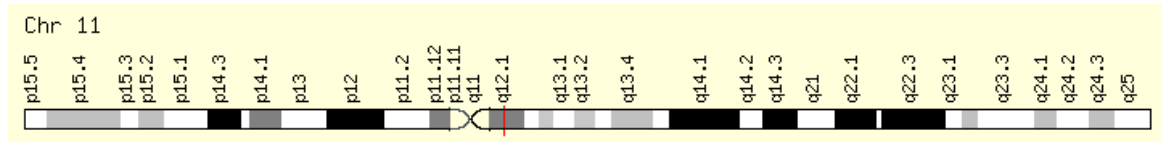
2. ΤΟ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ - ΚΑΟ (Hereditary Angioedema – ΗΑΕ)

2.1 Επιδημιολογία

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση κάθε πάθηση, η οποία προσβάλλει λιγότερα από 1 προς 2.000 άτομα του γενικού πληθυσμού, ανήκει στις σπάνιες παθήσεις. Παγκοσμίως η αναφερόμενη μέση συχνότητα του ΚΑΟ είναι 1 προς 50.000 άτομα (εύρος 1/10.000 – 1/150.000).¹⁻⁴ Λόγω ακριβώς της σπανιότητας της νόσου παρατηρούνται μεγάλα ποσοστά υποδιάγνωσης, καθυστερημένης ή και εσφαλμένης διάγνωσης και κατά συνέπεια ανεπαρκούς αντιμετώπισης.⁵ Σύμφωνα με τον παραπάνω παγκόσμιο επιπολασμό του ΚΑΟ και κατά μέση προβλεπόμενη συχνότητα υπολογίζεται να υπάρχουν περί τους 200 ασθενείς στην Ελλάδα (100-1000), όμως μέχρι το 2009 είχαν αναφερθεί ελάχιστες μόνο περιπτώσεις ΚΑΟ.⁶⁻⁹

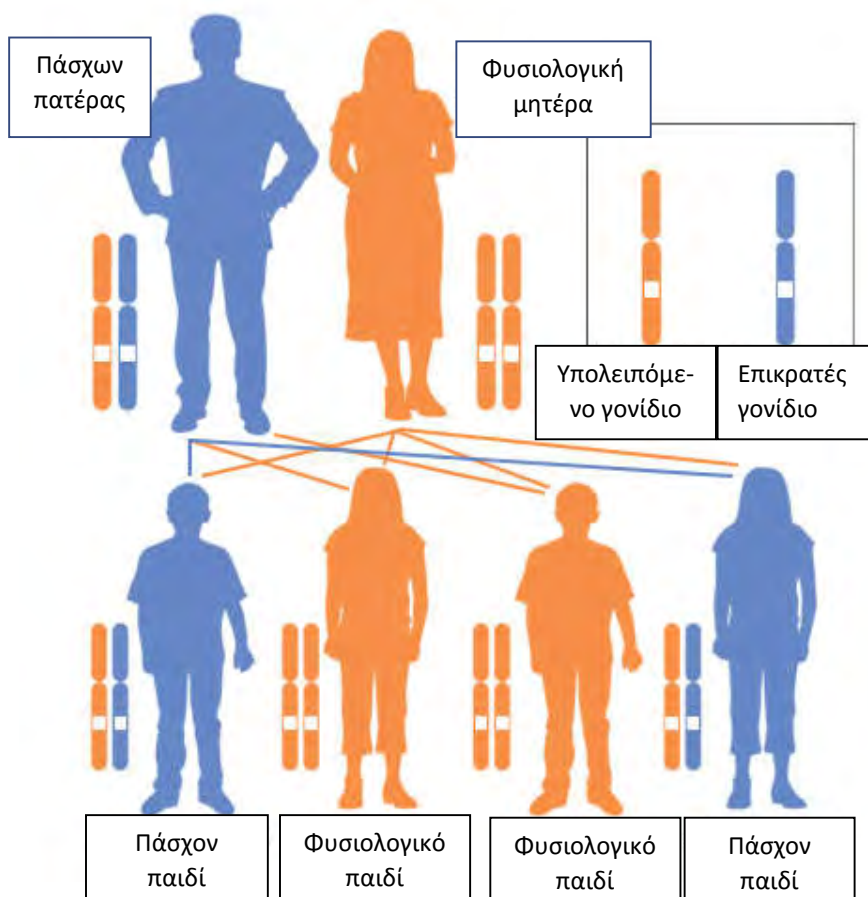
2.2 Γενετική βλάβη

Το ΚΑΟ είναι γενετική πάθηση και οφείλεται σε μετάλλαξη ενός εκ των δύο αλληλομόρφων γονιδίων του C1-INH. Ελάχιστες περιπτώσεις ομόζυγης βλάβης έχουν ανακοινωθεί λόγω αιμομιξίας.¹⁰⁻¹² Το γονίδιο του C1-INH (**SERPING1**) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11, στη θέση 11q12-q13.1, από το ζεύγος βάσεων 57,597,553 ως το 57,614,852 (Εικόνα 3). Έτσι εκτείνεται σε περιοχή 17 κιλοβάσεων (kb) , αποτελούμενο από 8 εξόνια με τα ιντρόνια να περιέχουν 17 επιλαμβανόμενες Alu αλληλουχίες.¹³⁻¹⁵ Αυτές οι αλληλουχίες έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των πρωτευνόντων και φαίνεται να προσδίδουν γενετική αστάθεια οδηγώντας σε διπλασιασμούς, ελλείψεις, αντιμεταθέσεις ή εισαγωγές σε διαφορετική συχνότητα.¹⁶



Εικόνα 3. Η θέση του γονιδίου *SERPING1* στο χρωμόσωμα 11 (από <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERPING1&keywords=serping1>)

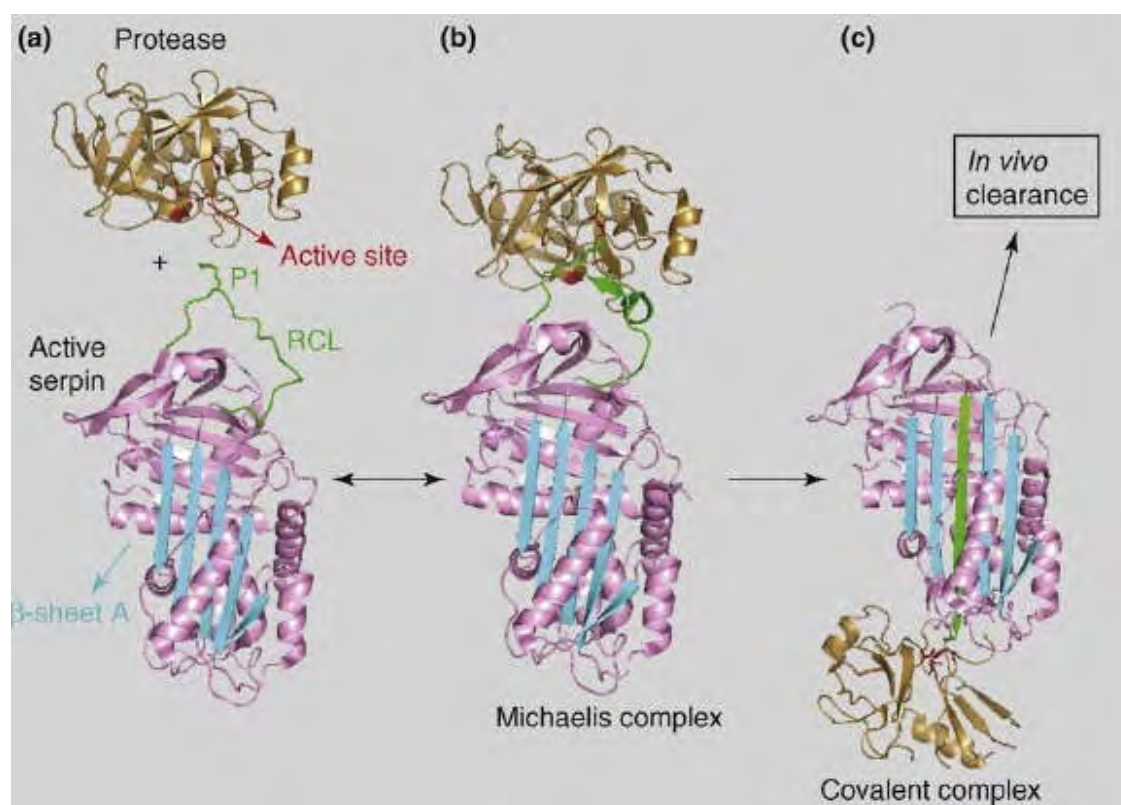
Το ΚΑΟ κληρονομείται κατά τον **σωματικό επικρατούντα** τρόπο, με σχεδόν πλήρη διεισδυτικότητα και ελάχιστους ασυμπτωματικούς φορείς (Εικόνα 4). Σε ένα ποσοστό περίπου 25% των περιπτώσεων η μετάλλαξη εμφανίζεται **de novo**.¹⁷ Οι μεταλλάξεις του *SERPING1* παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ετερογένεια και έχουν περιγραφεί πλέον πάνω από 400. Οι μεταλλάξεις της νόσου είναι συγκεντρωμένες σε μεγάλη παγκόσμια γενετική βάση δεδομένων (OMIM ID 106100, Human Gene Mutation Database 119041) και σε μια βάση δεδομένων ειδική για τη νόσο (<http://hae.enzim.hu>).¹⁸



Εικόνα 4. Τρόπος κληρονόμησης του ΚΑΟ (από <http://www.mayoclinic.org/autosomal-dominant-inheritance-pattern/img-20006210>)

2.3 Η παθοφυσιολογία του ΚΑΟ και ο ρόλος του αναστολέα του C1 κλάσματος του συμπληρώματος

Ο **C1-INH**, μαζί με την α_1 - αντιθρυψίνη και άλλες ρυθμιστικές πρωτεάσες, ανήκει στην ομάδα **των αναστολέων των πρωτεασών σερίνης** (σερπίνες - serpins).¹⁹ Στην Εικόνα 5 φαίνεται σχηματικά ο μηχανισμός δράσης του C1-INH. Ο C1-INH, όπως και οι υπόλοιπες

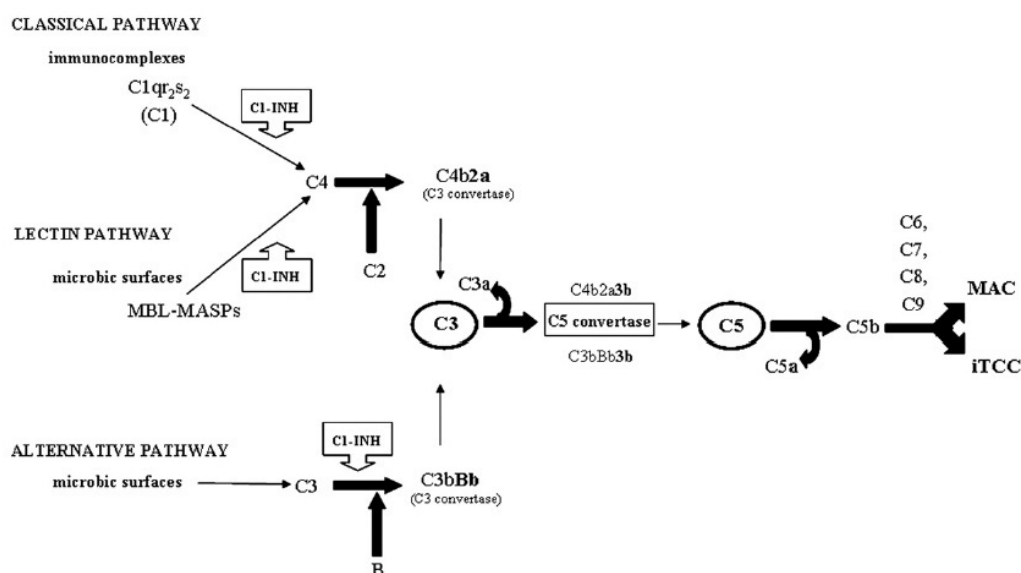


Εικόνα 5. Μηχανισμός αναστολής C1-INH (serpin) από Cugno et al. ²⁰

Η ενεργοποιημένη σερίνη χαρακτηρίζεται από μια πενταπλή αλυσίδα με β -διαμόρφωση και ένα εκτεθειμένο κεντρικό βρόχο (RCL) που παρουσιάζει το P1 υπόλειμμα στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης – στόχου (χρυσό χρώμα). Στο αρχικό βήμα (α) γίνεται η σύνδεση της ελεύθερης πρωτεάσης με την ενεργή σερίνη μέσω του RCL. Στο επόμενο βήμα η πρωτεάση «κόβει» την σερίνη και προκαλεί στερεοχημικές μεταβολές στο μόριο της σερίνης. Συγκεκριμένα το RCL τμήμα της σερίνης εισέρχεται ως αλυσίδα 4 μεταξύ της αλυσίδας 3 και 5 του φύλλου A με β -διαμόρφωση όπως η κίνηση της «ποντικοπαγίδας». Έτσι η πρωτεάση-στόχος ακολουθεί την κίνηση του βρόχου RCL, μετατοπίζεται στο αντίθετο άκρο και αναστέλλεται η δράση της πρωτεάσης λόγω παραμόρφωσης του ενεργού κέντρου της. Το ανενεργό, ομοιοπολικό και μη αντιστρεπτά συνδεδεμένο, σύμπλεγμα σερίνης – πρωτεάσης (c) παρουσιάζει νέα επιτόπια, τα οποία αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς και έτσι το σύμπλεγμα απομακρύνεται από την κυκλοφορία.

σερπίνες, επιτελεί το σκοπό του αποτελώντας ο ίδιος το υπόστρωμα του ενζύμου, το οποίο θα αναστείλει. Σχηματίζεται αρχικά ένα αντιστρεπτό σύμπλεγμα C1-INH και πρωτεάσης. Στη συνέχεια με τη δράση της πρωτεάσης στον C1-INH, πραγματοποιούνται στερεοχημικές μεταβολές και δημιουργείται ένα σύμπλεγμα C1-INH - πρωτεάσης, το οποίο πλέον είναι ομοιοπολικά και μη αντιστρεπτά συνδεδεμένο (Εικόνα 5). Το σύμπλεγμα αυτό απομακρύνεται από την κυκλοφορία μέσω ειδικών υποδοχέων.^{21, 22} Ο C1-INH εμφανίζει **πολλαπλή ανασταλτική δράση** και συγκεκριμένα:

α) Αναστέλλει το C1r και το C1s κατά το σχηματισμό του συμπλέγματος C1q₂s₂ αποτελώντας έτσι το **μοναδικό αναστολέα της ενεργοποίησης της κλασσικής οδού του συμπληρώματος** (Εικόνα 6).^{23, 24}



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του ενζυμικού «καταρράκτη» του συμπληρώματος από Bossi et al.²⁵ Και οι τρεις οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος ελέγχονται από τον C1-INH . Αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα του C1r και του C1s στην κλασσική οδό, τις MASPs στην οδό της λεκτίνης και το C3b στην εναλλακτική οδό παρεμβαίνοντας τελικά στο σχηματισμό της C3 κομβερτάσης.

β) Απενεργοποιεί τη MASP-1 και MASP-2 (mannose-binding protein-associated serine protease) με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος μέσω της οδού της λεκτίνης της μαννόζης (mannose binding lectin, MBL), αλλά και την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος αναστέλλοντας το C3b (Εικόνα 6).^{26, 27}

γ) Αναστέλλει τον ενεργοποιημένο παράγοντα XII (activated FXII, FXIIa) και την καλλικρεΐνη (plasma kallikrein, KL) πλάσματος αποτελώντας έτσι **κύριο ρυθμιστικό παράγοντα του συστήματος κινινών - καλλικρεΐνης** (kinine - kallikrein system, KKS) **στο πλάσμα, δηλαδή του συστήματος επαφής** (contact system, CS) (Εικόνα 7). Ο C1-INH είναι υπεύθυνος για το 90% της αναστολής του FXIIa και το 50% της αναστολής της KL. Μαζί με την α2-μακροσφαιρίνη, ένα άλλο μέλος της ομάδας των σερπινών, ευθύνονται αθροιστικά για το 90% της αναστολής της KL.^{28, 29} Από τα παραπάνω καταδεικνύεται ο κεντρικός ρόλος του C1-INH στην αναστολή του KKS στο πλάσμα.

δ) Αναστέλλει τις πρωτεάσες του ινωδολυτικού συστήματος, όπως την πλασμίνη (plasmin, PL) και τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tissue plasminogen activator, tPA).

ε) Και τέλος αναστέλλει τον παράγοντα XIa της ενδογενούς οδού της πήξης του αίματος.¹⁹ Συμπερασματικά ο C1-INH ρυθμίζει **ένα εύρος φυσιολογικών λειτουργιών** όπως η αγγειακή ομοιόσταση, η φλεγμονή, η πήξη και η ινωδογονόλυση. Αυτή η κεντρική σημασία του φαίνεται στην εικόνα 7.

Έχοντας υπόψιν τα παραπάνω αντιλαμβανόμαστε ότι η βιολογική λειτουργία του C1-INH είναι πολύ σημαντική. Έτσι αν για κάποιο λόγο, είτε γενετικό όπως στο ΚΑΟ λόγω μετάλλαξης του *SERPING1*, είτε επίκτητο όπως στο ΕΑΟ λόγω αδρανοποιητικών αυτοαντισωμάτων, **ανεπαρκεί ο C1-INH**, θα υπάρχουν οι εξής βιολογικές συνέπειες στα παρακάτω μονοπάτια:

- **Συνεχής ενεργοποίηση της κλασσικής οδού του συμπληρώματος** και δημιουργία του συμπλόκου C1q₂s₂, λόγω τόσο της φυσιολογικής αυτοενεργοποίησης του C1, όσο και της πιθανής ενεργοποίησης του C1 κατά την κυτταρική απόπτωση μέσω διάφορων μηχανισμών.³⁰⁻³² Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου C1q₂s₂ οδηγεί στη διάσπαση του C4 και μετά του C2 (Εικόνα 6). Ο C3 όμως δεν προλαβαίνει να καταναλωθεί λόγω πιθανού ελέγχου του ενζυμικού “καταρράκτη» από άλλους αναστολείς του συμπληρώματος όπως ο C4 binding protein και ο Factor I. Κατά συνέπεια η τιμή του C3 στο πλάσμα δε μεταβάλλεται στους ασθενείς με ΚΑΟ. Ο C4 είναι ελαττωμένος (σε όλους κατά τις κρίσεις και σχεδόν σε όλους μεταξύ των κρίσεων) λόγω της συνεχούς διέγερσης της κλασσικής οδού του συμπληρώματος. Ο δε C2 είναι κατά κύριο λόγο μειωμένος επί των κρίσεων.³³⁻³⁵

(Εικόνα 7).³⁸⁻⁴¹ Ταυτόχρονα η PL με μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης διεγείρει το tPA. Η PL δε διασπά όμως μόνο το ινωδογόνο, αλλά έχει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων όπως ενεργοποίηση προκαλλαγενασών (διάσπαση κολλαγόνου) και αυξητικών παραγόντων όπως ο TGF α (ιστικός αυξητικός παράγοντας α , Tissue Growth Factor α). Έτσι ο ρόλος της PL είναι ευρύτερος από ότι αρχικά πιστευόταν με συμμετοχή σε πολλές διεργασίες, όπως στην αναδόμηση των ιστών ή στη μετανάστευση και λειτουργία των νευρικών κυττάρων.⁴²
⁴³ Ο άλλος ενεργοποιητής της PL, ο ενεργοποιητής της ουροκινάσης του πλασμινογόνου (Urokinase Plasminogen Activator, uPA), μόνο όταν είναι συνδεδεμένος με τον υποδοχέα του ενεργοποιητή της ουροκινάσης του πλασμινογόνου (Urokinase plasminogen activator receptor, uPAR) στην κυτταρική μεμβράνη των ιστών, διεγείρει την παραγωγή PL και τον καταβολισμό της εξωκυττάριας μητρικής ουσίας και πιθανώς να εμπλέκεται στην αποκατάσταση του ιστικού τραυματισμού και στις μεταστάσεις των καρκινικών κυττάρων.⁴⁴

Ο C1-INH μπορεί να αναστείλει και την PL και τον tPA.⁴⁵⁻⁴⁹ Όσον αφορά την PL δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ανασταλτικό ρόλο in vivo, καθώς ο κυριότερος αναστολέας της πλασμίνης είναι η α 2-αντιπλασμίνη.⁵⁰ Όσον αφορά τον tPA, ο C1-INH φαίνεται ότι παίζει ανασταλτικό ρόλο σε κάποιες καταστάσεις.^{46, 51, 52} Ο tPA αναστέλλεται κυρίως από 4 ξεχωριστούς τύπους αναστολέων: PAI-1 (plasminogen activator inhibitor -1, αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1), PAI-2 (plasminogen activator inhibitor-2, αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-2), PAI-3 (plasminogen activator inhibitor-3, αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-3) και η πρωτεάση νεξίνη. Εξ' αυτών ο πιο σημαντικός αναστολέας πλάσματος του tPA είναι το PAI-1. Ο PAI-1 βρίσκεται σε περίσσεια στο πλάσμα, ώστε το μεγαλύτερο τμήμα του tPA να είναι συνδεδεμένο με PAI-1 και έτσι να μην ενεργοποιείται πρώιμα η ινωδόλυση.⁵³

Κατά τη διάρκεια της κρίσης του ΚΑΟ - και όχι στα μεσοδιαστήματα - υπάρχει **σημαντική παραγωγή PL**, όπως μετράται από το σχηματισμό συμπλεγμάτων PL και α 2-αντιπλασμίνης. Καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα για την ενεργοποίηση του tPA ή του uPA κατά την κρίση του ΚΑΟ, η απευθείας ενζυμική δράση του FXIIa πιθανολογείται ως υπεύθυνη για την παραγωγή PL και υπάρχουν μερικά in vivo δεδομένα που το υποστηρίζουν.^{54, 55} Όσον αφορά το σύστημα πήξης φαίνεται ελάχιστα ή καθόλου

ενεργοποιημένο, καθώς **μικρές μόνο ποσότητες θρομβίνης μπορούν να σχηματισθούν κατά την κρίση του ΑΟ.**^{56,57}

Έτσι στο ΚΑΟ, λόγω μετάλλαξης στο *SERPING1* που κωδικοποιεί τον C1-INH, ο C1-INH ανεπαρκεί. Ανάλογα με την υποκείμενη διαταραχή διακρίνουμε δύο τύπους ΚΑΟ, οι οποίοι όμως δεν παρουσιάζουν διαφορά ως προς την κλινική τους έκφραση.⁵⁸ Όταν η γενετική βλάβη προκαλεί μειωμένη παραγωγή της πρωτεΐνης, εμφανίζεται ο **τύπος I ΚΑΟ** και τέτοιες βλάβες ανευρίσκονται σε όλη την έκταση του γονιδίου. Όταν η γενετική βλάβη αφορά το ενεργό κέντρο του ενζύμου, τότε προκαλεί την παραγωγή και την έκκριση μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, σε ικανή μεν ποσότητα χωρίς όμως να διαθέτει επαρκή ενεργότητα, οπότε έχουμε **τον τύπο II ΚΑΟ** και τέτοιες βλάβες εντοπίζονται στο εξόνιο 8 και συνήθως στο κωδικό 466.^{59, 60} Στο τύπου I ΚΑΟ (περίπου 85% των ασθενών), η αντιγονική συγκέντρωση του C1-INH στον ορό είναι μικρότερη του 35% της φυσιολογικής και κατ' επέκταση και η συνολική ενζυμική δραστηριότητα. Στο τύπου II ΚΑΟ (περίπου 15% των περιπτώσεων) η συγκέντρωση του C1-INH ανευρίσκεται φυσιολογική ή και αυξημένη, αλλά η πρωτεΐνη είναι δυσλειτουργική, οπότε και πάλι είναι ελαττωμένη η συνολική ενζυμική δραστηριότητα.

Στο ΚΑΟ I και II είναι ενδιαφέρον, ότι παρά την συνύπαρξη φυσιολογικού αλληλομόρφου γονιδίου, η λειτουργικότητα του C1-INH είναι μικρότερη από το αναμενόμενο 50% του φυσιολογικού. Στην αρχή το γεγονός αποδόθηκε στον αυξημένο καταβολισμό του φυσιολογικού C1-INH στους ασθενείς, αλλά αργότερα βρέθηκε μειωμένη παραγωγή mRNA C1-INH μέσω RT-PCR, εισάγοντας την υπόθεση της καταστολής (downregulation) του mRNA του υγιούς γονιδίου.^{61, 62}

2.4 Κλινική εικόνα

Στο ΚΑΟ τα επεισόδια χαρακτηρίζονται από εξαγγείωση του πλάσματος: α) στις βαθύτερες στοιβάδες του δέρματος, β) στον βλεννογόνο του λάρυγγα, γ) στον βλεννογόνο του εντέρου. Το επεισόδιο ΑΟ είναι αυτοπεριοριζόμενο και συνήθως διαρκεί 2-5 ημέρες. Αναλυτικότερα:

α) Το οίδημα του **δέρματος** είναι χωρίς κνησμό, χωρίς πόνο, με ασαφή όρια, δεν αφήνει εντύπωμα και δεν ανταποκρίνεται στα αντιϊσταμινικά. Εντοπίζεται κυρίως σε περιοχές με χαλαρό συνδετικό ιστό όπως στο πρόσωπο (χείλη, γλώσσα, παρειά) (Εικόνα 8), στα άκρα και τα γεννητικά όργανα.⁶³ Εμφανίζεται στην μέγιστη πλειοψηφία των ασθενών (>90%).



Εικόνα 8. Χαρακτηριστική εικόνα ασθενούς με ΑΟ στο άνω χείλος κυρίως (προσωπικό αρχείο)

β) Το οίδημα του **λάρυγγα** παρατηρείται στους μισούς ασθενείς περίπου και μπορεί να προκαλέσει οξεία απόφραξη του ανώτερου αναπνευστικού (Εικόνα 9). Συνήθως εισβάλλει βαθμιαία με αλλοίωση της φωνής, δυσκαταποσία και δυσφαγία, ενώ μπορεί να καταλήξει σε πλήρη απόφραξη της αναπνευστικής οδού. Σπανιότερα αναφέρεται οίδημα λάρυγγα ταχέως εξελισσόμενο ακόμα και σε χρονικό διάστημα 20 λεπτών.⁶⁴ Οι θάνατοι στο ΚΑΟ προκαλούνται κατά κανόνα από αυτή την επιπλοκή.⁶⁴ Κυρίως παλαιότερα, πριν την είσοδο των ειδικών θεραπειών, αρκετοί ασθενείς είχαν υποστεί διασωλήνωση ή τραχειοτομία λόγω οιδήματος στον λάρυγγα. Επικίνδυνες για την εμφάνιση ΑΟ λάρυγγα στο ΚΑΟ είναι οδοντιατρικές ή χειρουργικές επεμβάσεις στην περιοχή του προσώπου και γενικότερα τραυματισμοί σε γειτνιάζοντες ιστούς του λάρυγγα.



Εικόνα 9. Χαρακτηριστική εικόνα ασθενούς με ΑΟ στον λάρυγγα από Bas et al. ⁶⁵

γ) Η προσβολή του **γαστρεντερικού** αναφέρεται στο 70 με 80 % των ασθενών με ΚΑΟ.⁶⁶⁻⁶⁸ Η κρίση μπορεί να είναι από ήπια ως σοβαρή, με αφόρητο πόνο που συνοδεύεται από εμετό ή/και διάρροια και να έχει την εικόνα ειλεού (Εικόνα 10). Οι έμετοι μπορεί να είναι έντονοι και πολυάριθμοι, με αποτέλεσμα μεγάλη απώλεια υγρών από των αγγειακό χώρο, σημαντική αφυδάτωση και λευκοκυττάρωση. Είναι συχνό (30%) ασθενείς με κρίση στο έντερο να οδηγούνται άσκοπα στο χειρουργείο λόγω λανθασμένης διάγνωσης οξείας κοιλίας.¹



Εικόνα 10. Αξονική τομογραφία ασθενούς με ΚΑΟ με σημαντικού βαθμού οίδημα του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου (λευκά βέλη) από Benrajab et al. ⁶⁹

Η ηλικία εμφάνισης του ΚΑΟ ποικίλει ευρύτατα. Οι κρίσεις του ΚΑΟ ξεκινούν στους μισούς ασθενείς στην πρώτη δεκαετία της ζωής και στους άλλους μισούς περίπου στη δεύτερη δεκαετία.⁶⁶ Γενικά είναι εξαιρετικά σπάνιο η πρώτη κρίση να εμφανίζεται μετά τα

40 έτη. Σπάνια υπάρχουν ασυμπτωματικοί ενήλικες φορείς της νόσου. Επίσης έχει δειχθεί σε μελέτες ότι η πρώιμη έναρξη των συμπτωμάτων σχετίζεται με τη σοβαρότερη πορεία της νόσου.^{70, 71}

Εκλυτικά αίτια των κρίσεων του ΚΑΟ αποτελούν το μηχανικό τραύμα και η έντονη πίεση των ιστών, οι οδοντιατρικές εργασίες, οι χειρουργικές επεμβάσεις (κυρίως στην περιοχή του προσώπου), το ψυχικό στρες, οι ιογενείς λοιμώξεις και φάρμακα (όπως οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου και τα αντισυλληπτικά). Άλλοτε πάλι, αρκετά συχνά, δεν ανιχνεύεται προφανής λόγος.

Πριν την εμφάνιση των κρίσεων του ΚΑΟ μπορεί να εμφανισθούν κάποια **πρόδρομα συμπτώματα** όπως ένα χαρακτηριστικό εξάνθημα (δακτυλιοειδές ερύθημα – erythema marginatum - Εικόνα 11) ή/και αίσθημα κακουχίας, ναυτίας, γριπώδης συνδρομή κ.ά.^{63, 72}



Εικόνα 11. Εικόνα ασθενούς με δακτυλιοειδές ερύθημα (*erythema marginatum*) στο αριστερό αντιβράχιο λίγο πριν την κρίση ΚΑΟ (προσωπικό αρχείο)

2.5 Κλινική βαρύτητα και συσχέτιση με τροποποιητικούς παράγοντες

Η βαρύτητα του ΚΑΟ μπορεί να μεταβάλλεται στον ίδιο ασθενή ακόμα και στη διάρκεια της ζωής του. Επίσης άτομα με ΚΑΟ, που ανήκουν στην ίδια οικογένεια και φέρουν την ίδια μετάλλαξη, παρουσιάζουν διαφορετική κλινική εικόνα σε σημαντικό βαθμό, γεγονός που υποδηλώνει ότι άλλοι επιπρόσθετοι παράγοντες (γενετικοί και περιβαλλοντικοί) επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου. Το εύρος της συχνότητας των επεισοδίων μπορεί να κυμαίνεται από μία ασυμπτωματική εικόνα (σπάνιες περιπτώσεις), ως και συχνά εβδομαδιαία επεισόδια. Ορισμένα από αυτά τα επεισόδια είναι επικίνδυνα για τη ζωή των ασθενών με σημαντική επιβάρυνση της ζωής τους και του συστήματος υγείας.^{63, 73, 74} Η κλινική βαρύτητα της νόσου δεν είχε συσχετιστεί αρχικά με το είδος της μετάλλαξης με εξαίρεση ορισμένα πρόσφατα άρθρα.⁷⁵⁻⁷⁸ Αναλυτικότερη αναφορά σχετικά με την επίδραση των γενετικών παραγόντων στο φαινότυπο του ΚΑΟ γίνεται στο κεφάλαιο 4 με τίτλο «Γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον φαινότυπο του ΚΑΟ».

Όσον αφορά τους **εργαστηριακούς δείκτες**, ο φαινότυπος του ΚΑΟ δε φάνηκε να σχετίζεται με τη λειτουργικότητα του C1-INH.⁷⁹ Αντίθετα, σε άλλη μελέτη βρέθηκε συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με τα επίπεδα του λειτουργικού C1-INH κατά τη στιγμή της διάγνωσης (baseline value), αλλά όχι με τα επίπεδα του C4, τον αντιγονικό προσδιορισμό του C1-INH και την αιμολυτική ικανότητα του συμπληρώματος (CH50).⁸⁰ Είναι γνωστό ότι η λήψη οιστρογόνων, όπως και η φάση του έμμηνου κύκλου επηρεάζουν την συχνότητα των επεισοδίων. Βρέθηκε ότι οι υψηλές τιμές προγεστερόνης ($\geq 4\text{nmol/l}$), και οι χαμηλές της SHBG (sex hormone binding globulin) ($< 40\text{nmol/l}$) σχετίζονται με αυξημένη συχνότητα κρίσεων ανεξαρτήτως ηλικίας, φάσης έμμηνου κύκλου και δόσης δαναζόλης.⁸¹

2.6 Η διάγνωση του ΚΑΟ

Οι ασθενείς που εμφανίζουν τα αναφερόμενα παραπάνω συμπτώματα θεωρούνται κλινικά ύποπτοι για τη νόσο και κατά συνέπεια διενεργείται εργαστηριακός έλεγχος. Το αρνητικό οικογενειακό ιστορικό κρίσεων ΑΟ δεν αποκλείει τον έλεγχο αυτό, διότι όπως αναφέρθηκε το 25% των μεταλλάξεων του ΚΑΟ είναι de novo.

Αρχικά προτείνεται η μέτρηση του C4, ως τεστ διαλογής, λόγω της ευκολίας μέτρησής του. Το C4 στον ορό είναι μειωμένο στο 98% των ασθενών με ΚΑΟ μεταξύ των κρίσεων και στο 100% εντός της κρίσης. Η διάγνωση συμπληρώνεται και επιβεβαιώνεται με την αντιγονική (ποσοτική) και λειτουργική μέτρηση (εφόσον είναι διαθέσιμη) του C1-INH στον ορό. Έλεγχος θα πρέπει να γίνεται και σε ασυμπτωματικά άτομα με θετικό οικογενειακό ιστορικό, ώστε επί εμφάνισης της πρώτης κρίσης να είναι διαθέσιμη η αντιμετώπιση και να αποφεύγονται οι επιπλοκές της νόσου.

Πίνακας 1. Κριτήρια διάγνωσης του ΚΑΟ με ανεπάρκεια του C1-INH από Agostoni et al.⁶³

Κλινικά κριτήρια - Μείζονα

1. Αυτοπεριοριζόμενο υποδόριο αγγειοοίδημα χωρίς κνιδωτικό εξάνθημα, μη φλεγμονώδες, συχνά υποτροπιάζον, διάρκειας πάνω από 12 ώρες.
2. Αυτοπεριοριζόμενος κοιλιακός πόνος, χωρίς εμφανή οργανική αιτία, συχνά υποτροπιάζων και με διάρκεια πάνω από 6 ώρες.
3. Υποτροπιάζον οίδημα λάρυγγα.

Ελάχιστον κλινικό κριτήριο είναι η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού υποτροπιαζόντων επεισοδίων με αγγειοοίδημα δέρματος ή κοιλιακό πόνο ή οίδημα λάρυγγα.

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 *SERPING1* που τροποποιούν την σύνθεση και τη λειτουργία του C1-INH.

Στον Πίνακα 1 αναγράφονται τα κριτήρια διάγνωσης του ΚΑΟ από ανεπάρκεια του C1-INH σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται, εάν υφίσταται ένα

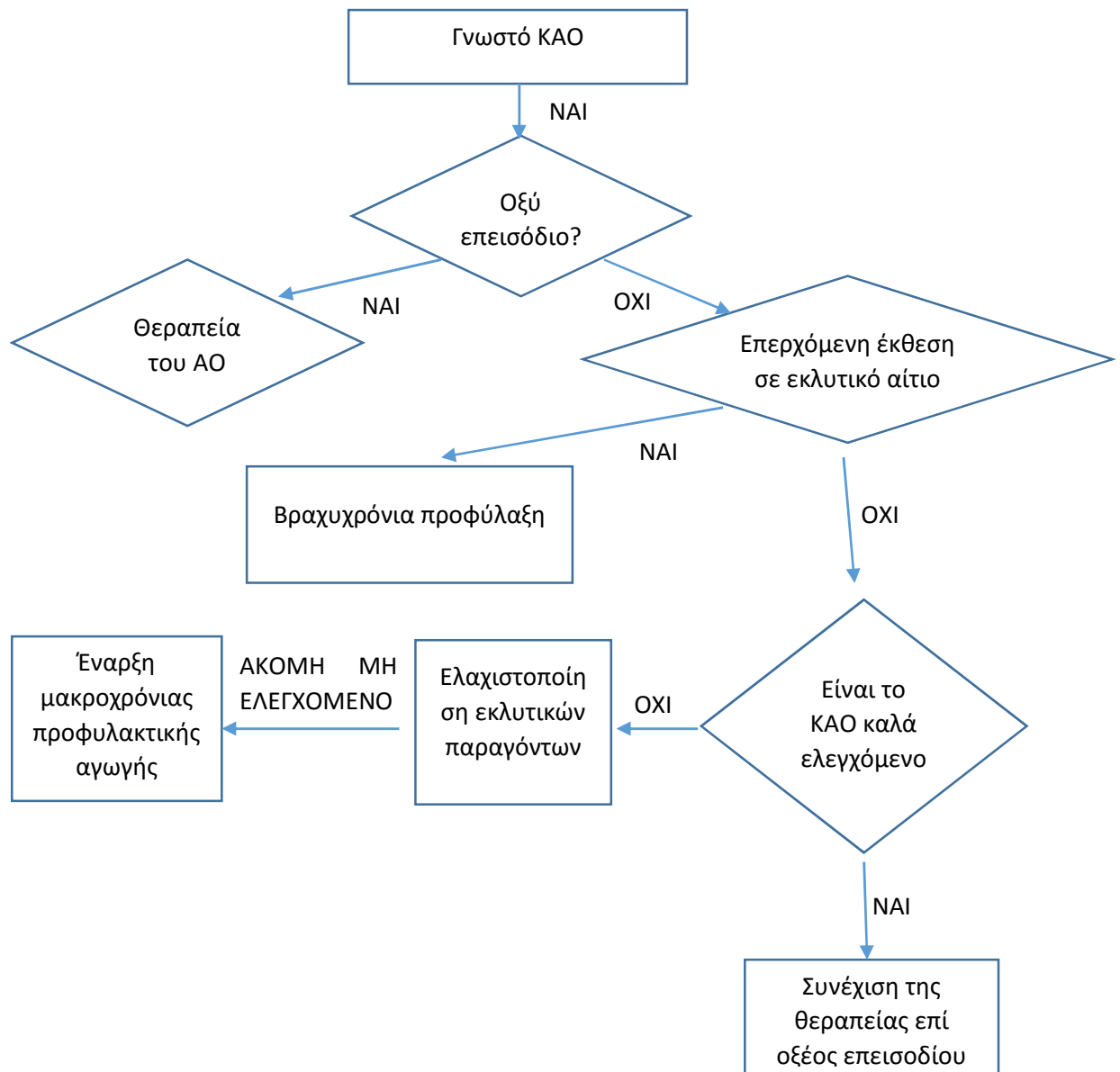
μείζον κλινικό και ένα εργαστηριακό κριτήριο.⁸² Προτείνεται ότι η διάγνωση του ΚΑΟ να βασίζεται σε δύο ξεχωριστές ελαττωμένες μετρήσεις του C4 και των ποσοτικών ή / και λειτουργικών επιπέδων C1-INH εντός διαστήματος 1 - 3 μηνών.⁸³

Όσον αφορά τις μεθόδους μέτρησης της δραστικότητας του C1-INH υπάρχουν δύο: α) η χρωμογόνος (chromogenic) και β) η ανοσοενζυμική (immunoenzymatic -ELISA), οι οποίες δεν αποτελούν εργαστηριακές εξετάσεις ρουτίνας. Βασίζονται στην μέτρηση της ικανότητας του πλάσματος να αναστέλλει τη δραστικότητα εστεράσης ενός συγκεκριμένου ποσού C1s.⁸⁴ Η χρωμογόνος δοκιμασία συνήθως προτιμάται λόγω της υψηλότερης θετικής προγνωστικής αξίας, που φτάνει κοντά στο 100%. Τα δείγματα του αίματος για τη λειτουργική δοκιμασία θα πρέπει να λαμβάνονται με προσοχή με σκοπό την αποφυγή απώλειας δραστικότητας in vitro.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, η ανίχνευση της μετάλλαξης στο *SERPING1* αποτελεί εργαστηριακό διαγνωστικό κριτήριο και μπορεί να θέσει τη διάγνωση του ΚΑΟ. Όμως η ετερογένεια των μεταλλάξεων που ευθύνονται για το ΚΑΟ κάνει τη γενετική διάγνωση σχετικά περίπλοκη και επίπονη. Η μετάλλαξη ανευρίσκεται στο 90-95% των περιπτώσεων.^{60, 77, 85} Η γενετική διάγνωση είναι: α) απαραίτητη κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους της ηλικίας, όπου τα επίπεδα του C1-INH στο πλάσμα ενδέχεται να δίνουν ψευδώς αρνητικά συνήθως, ή ψευδώς θετικά αποτελέσματα και β) χρήσιμη σε περιπτώσεις αμφιβόλων εργαστηριακών μετρήσεων του C1-INH και αντιφωνίας με την κλινική εικόνα.¹

2.7 Η θεραπεία του ΚΑΟ

Από την στιγμή που θα τεθεί η διάγνωση, η θεραπεία του ΚΑΟ περιλαμβάνει τρεις κατευθύνσεις: α) τη μακροχρόνια προφύλαξη μέσω της φαρμακευτικής αγωγής και της αποφυγής των εκλυτικών αιτίων του ΑΟ, β) τη βραχυχρόνια προφύλαξη, όταν ο ασθενής εκτεθεί σε κατάσταση με αυξημένη πιθανότητα κρίσης ΑΟ π.χ. οδοντιατρική πράξη και γ) την αντιμετώπιση των οξέων επεισοδίων του ΑΟ. Αυτές οι κατευθύνσεις συνοψίζονται στον παρακάτω αλγόριθμο στην Εικόνα 12 από διεθνείς οδηγίες.⁸⁶ Στην επόμενη Εικόνα 13 απεικονίζονται σχηματικά οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης των φαρμάκων του ΚΑΟ.



Εικόνα 12. Ο αλγόριθμος της θεραπείας του ΚΑΟ όπως προτείνεται από τις διεθνείς οδηγίες τροποποιημένο στα Ελληνικά (Zuraw et al.)⁸⁶

2.7.1 Η μακροχρόνια προφύλαξη (long term treatment)

Αποσκοπεί στην πρόληψη των επεισοδίων του ΚΑΟ. Με βάση την κλινική εμπειρία προτείνεται συνήθως σε ασθενείς με συχνά επεισόδια (συνήθως περισσότερα του ενός μέτριων-σοβαρών επεισοδίων ανά μήνα ή με συνολική διάρκεια μεγαλύτερη από 24 ημέρες ανά χρόνο) παρά την προσπάθεια μείωσης των εκλυτικών αιτιών.⁶³ Συνεκτιμάται η

σοβαρότητα της νόσου με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της προφύλαξης.⁸⁷

Για τη θεραπεία αυτή χρησιμοποιούνται τρεις ομάδες φαρμάκων:

- **Παράγωγα ανδρογόνων** . Προτιμώνται τα 17 α-αλκυλιωμένα ανδρογόνα που έχουν μεγαλύτερο λόγο αναβολικής δράσης προς ανδρογονικής όπως η δαναζόλη και η σταναζόλη. Η αποτελεσματικότητά τους φαίνεται να οφείλεται στην αναβολική δράση στο ήπαρ με την παραγωγή C1-INH, αλλά πιθανώς και με άλλους μηχανισμούς.

Δυστυχώς τα ανδρογόνα παρουσιάζουν συχνά ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες είναι κυρίως δοσο-εξαρτώμενες και χρονο-εξαρτώμενες. Περισσότερο ευαίσθητες σε αυτές είναι οι γυναίκες. Παρατηρείται αύξηση βάρους, βράγχος φωνής, υπερτρίχωση, διαταραχή της περιόδου και της libido, ακμή, διαταραχές λιπιδίων και ηπατικής λειτουργίας, υπέρταση, αθηρωμάτωση και σε σπάνιες περιπτώσεις ηπατικό αδένωμα ή ηπατοκυτταρικός καρκίνος. Λόγω παρενεργειών σε μια μελέτη το 24% διέκοψε την θεραπεία με ανδρογόνα.⁸⁸ Σήμερα προτείνεται να χορηγούνται οι πιο χαμηλές δόσεις ανδρογόνων με αποτελεσματικότητα, ώστε να μειώνονται οι σχετικά συχνές παρενέργειες.^{89, 90} Επιβάλλεται ο τακτικός έλεγχος της ηπατικής λειτουργίας και των λιπιδίων, υπερηχογραφικός έλεγχος ήπατος και έλεγχος της αρτηριακής πίεσης για όσους ασθενείς λαμβάνουν προφύλαξη με ανδρογόνα για μεγάλο διάστημα.^{87, 91} Αντενδείκνυται σε εγκύους και παιδιά.

- **Αντι-ινωδογονολυτικά**. Οι αντιϊνωδογονολυτικοί παράγοντες (όπως το τρανεξαμικό οξύ) φαίνεται ότι δρουν μέσω της ελάττωσης της παραγωγής της PL, η οποία προκαλεί ενεργοποίηση του FXII και του συστήματος επαφής (Εικόνα 13).⁹² Χρησιμοποιούνται κυρίως σε παιδιά διότι η χρήση των ανδρογόνων επιδρά στην ανάπτυξη τους ή σε ασθενείς που δεν ανέχονται τα ανδρογόνα. Πάντως έχουν μικρότερη αποτελεσματικότητα από αυτά. Αντένδειξη χρήσης τους αποτελεί η θρομβοφιλία ή ενεργός θρομβοεμβολική νόσος και οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι δυσπεψία, μυαλγίες, μυϊκή αδυναμία, κ.ά.^{82, 86, 93, 94}

- **Κεκαθαρμένος παράγοντας pdC1-INH** (plasma-derived C1-INH). Σε ασθενείς με πολύ συχνά επεισόδια έχει χρησιμοποιηθεί μακροχρόνια θεραπεία υποκατάστασης με ενδοφλέβια χορήγηση pdC1-INH ανά 3-4 ημέρες με επιτυχία.⁸² Αυτή η θεραπεία δεν καταργεί εντελώς τα επεισόδια σε κάθε ασθενή και ούτε είναι εξίσου αποτελεσματική μεταξύ διαφορετικών ασθενών.⁹⁵

2.7.2 Βραχυχρόνια προφύλαξη (short term treatment)

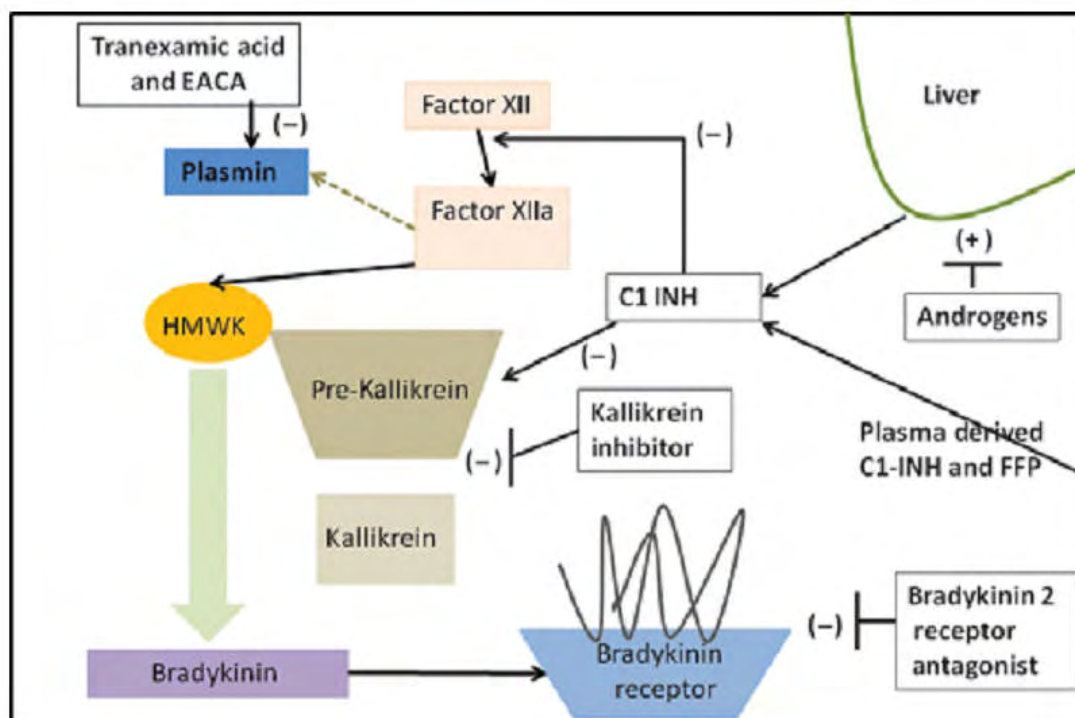
Απαιτείται όταν ο ασθενής με ΚΑΟ εκτεθεί σε καταστάσεις, οι οποίες δυνητικά προκαλούν κρίσεις ΑΟ. Θεωρείται απαραίτητη σε επεμβάσεις γενικής χειρουργικής, ιδιαίτερα της κεφαλής και του τραχήλου, καθώς και σε οδοντιατρικές επεμβάσεις λόγω της γειτνίασης με τον λάρυγγα. Το οίδημα έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να συμβεί στην περιοχή του τραύματος συνήθως μετά από 4-48 ώρες.⁹⁶ Ανάλογα με την βαρύτητα της επέμβασης χορηγούνται σε ήπιες εργασίες υψηλές ημερήσιες δόσεις ανδρογόνων πέντε μέρες πριν την επέμβαση και δύο ημέρες μετά, είτε σε μεγαλύτερο τραύμα των ιστών rdC1-INH 1-6 ώρες πριν την επέμβαση. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να υπάρχει και επιπλέον διαθέσιμος rdC1-INH για την αντιμετώπιση της εμφάνισης ΑΟ.⁸²

2.7.3 Αντιμετώπιση των κρίσεων αγγειοοιδήματος (acute treatment for attacks)

Τα τελευταία χρόνια αυξήθηκαν οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση των κρίσεων ΑΟ. Κάθε ασθενής θα πρέπει να έχει διαθέσιμα φάρμακα για την αντιμετώπιση των κρίσεων του ΚΑΟ και να εκπαιδύεται σε αυτοχορήγηση του φαρμάκου στην περίπτωση ΑΟ, εφόσον αυτό είναι εφικτό. Οι θεραπείες αυτές είναι αποτελεσματικές σε όλες τις θέσεις του ΑΟ βάσει μελετών ελεγχόμενων με placebo. Η θεραπευτική απάντηση είναι πιο γρήγορη, όσο συντομότερα ξεκινά η θεραπεία.⁸⁶ Τα δύο φάρμακα για την αντιμετώπιση των κρίσεων του ΚΑΟ, διαθέσιμα στην Ελλάδα τη στιγμή της συγγραφής, είναι:

- Η ενδοφλέβια χορήγηση συμπυκνωμένου **ανθρώπινου παράγοντα rdC1-INH** (plasma-derived C1-INH) είναι άμεσα αποτελεσματική σε όλες τις θέσεις αγγειοοιδήματος, όπως έχει επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες. Ο θεωρητικός κίνδυνος μετάδοσης ιογενών παραγόντων δεν έχει επιβεβαιωθεί στην πράξη, παρά την εκτεταμένη χρήση του για δεκαετίες. Γενικά έχει πολύ καλό προφίλ ασφάλειας και έχει πάρει ένδειξη αυτοχορήγησης στην Ευρωπαϊκή Ένωση.^{95, 97-99}
- Η **ικατιμπάντη** (Icatibant), ένα συνθετικό δεκαπεπτίδιο, είναι εκλεκτικός αναστολέας του B2 βραδυκινεργικού υποδοχέα (B2 receptor, B2R) και έχει διαπιστωθεί ότι

είναι αποτελεσματικό σε όλες τις κρίσεις ΑΟ (Εικόνα 13).¹⁰⁰⁻¹⁰² Χορηγείται υποδορίως και έχει πάρει ένδειξη αυτοχορήγησης. Οι παρενέργειες είναι συχνό τοπικό ερύθημα και πόνος στο σημείο της ένεσης του φαρμάκου. Το 10% μπορεί να παρουσιάσει υποτροπή του αγγειοιδήματος μετά από 16-24 ώρες, όπου χορηγείται με αποτελεσματικότητα και δεύτερη ένεση ικατιμπάντης.¹⁰⁰



Εικόνα 13. Θεραπευτικές παρεμβάσεις στο κληρονομικό αγγειοίδημα και πιθανοί μηχανισμοί δράσης των φαρμάκων από Xu et al.¹⁰³

Άλλα φάρμακα της οξείας κρίσης του ΚΑΟ που βρίσκονται σε διαδικασία έγκρισης είναι:

- Η **εκαλλαντίδη** (Ecallantide), μία μικρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που συντίθεται στο *Pichia Pastoris* και είναι ανταγωνιστής της ΚΙ του CS. Η χρήση του είναι αποτελεσματική, αν και σε ένα 3% περίπου παρουσιάζει αναφυλακτικά επεισόδια. Χορηγείται υποδορίως και έχει εγκριθεί για χορήγηση σε κρίσεις ΚΑΟ στις ΗΠΑ σε νοσοκομειακό περιβάλλον.^{104, 105}

- Ο ανασυνδυασμένος C1-INH (rhC1-INH) παράγεται με τη χρήση παραγωγού γάλακτος από ανασυνδυασμένα κουνέλια. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ίδια διαμόρφωση με τον C1-INH αλλά διαφορετική γλυκοζυλίωση. Η διαφορά αυτή επηρεάζει τη δραστηριότητα του φαρμάκου, όπως δείχνουν οι μελέτες και ο rhC1-INH έχει μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής σε σχέση με τον rdC1-INH. Παρενέργεια αποτελεί η αναφυλαξία σε άτομα αλλεργικά σε κουνέλια.^{106, 107}

2.8 Ποιότητα της ζωής των ασθενών στο ΚΑΟ

Η ποιότητα ζωής των ασθενών (quality of life, QoL) με ΚΑΟ είναι σαφώς επηρεασμένη σε πολλούς τομείς, καθώς ζουν με τις κρίσεις του ΚΑΟ. Τα άτομα πάσχουν πολλές φορές από άγχος, κατάθλιψη και απογοήτευση. Η ψυχολογική υγεία τους είναι επηρεασμένη και δεν μπορούν να εκτελούν καθημερινές δραστηριότητες. Επηρεάζεται η εργασία, η σχολική, η οικογενειακή ζωή και οι κοινωνικές τους σχέσεις. Παρουσιάζουν φόβο πιθανού θανάτου από ασφυξία και παρενέργειες από τα φάρμακα, κυρίως τα ανδρογόνα. Έχουν το φόβο αν τα παιδιά τους θα κληρονομήσουν το νόσημα και αισθάνονται ενοχές, εφόσον αυτό συμβεί.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Σε μελέτη 60 ενηλίκων ασθενών με ΚΑΟ με τυποποιημένα ερωτηματολόγια κατάθλιψης (Hamilton Depression and Anxiety Rating Scale) φάνηκε ότι το 40% βίωνε κατάθλιψη και το 15% είχε προεξέχων άγχος.¹¹¹ Η επιβάρυνση της QoL ήταν σαφώς σημαντικότερη πριν την εισαγωγή των θεραπειών για την αντιμετώπιση των κρίσεων ΑΟ και βελτιώθηκε σημαντικά μετέπειτα.^{108, 112, 113} Όμως ακόμη και τώρα, η νόσος επηρεάζει σημαντικά τη ζωή των ασθενών σε πολλούς τομείς.

2.9 Ειδικές μορφές αγγειοιδήματος χωρίς κνίδωση

2.9.1 ΚΑΟ με φυσιολογικό C1-INH (παλιότερα ΚΑΟ τύπου III)

Το ΚΑΟ με φυσιολογικό C1-INH είναι ο τρίτος τύπος ΚΑΟ, σπανιότερος των ΚΑΟ I και II, το οποίο και περιεγράφηκε το 2000.¹¹⁴ Αυτό που διακρίνει το ΚΑΟ με φυσιολογικό C1-INH από το κλασικό ΚΑΟ (τύπου I και II) είναι ότι παρουσιάζει φυσιολογικά επίπεδα αντιγονικά και λειτουργικά C1-INH και C4, δηλαδή **δεν υπάρχει ανεπάρκεια του C1-INH,**

όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.¹¹⁵ Φαίνεται ότι άλλοι μηχανισμοί κινητοποιούν το CS για τη δημιουργία της κρίσης του ΑΟ.

Πίνακας 2. Εργαστηριακές μεταβολές του συμπληρώματος στο ΚΑΟ, στο ΕΑΟ και στο ΑΟ από ACEi τροποποιημένο από Lang et al.¹¹⁶

	ΚΑΟ I	ΚΑΟ II	ΚΑΟ με φυσιολ. C1-INH	ΕΑΟ	ΑΟ από ACEi
Αντιγονικά επίπεδα C1-INH	↓	Φ ή ↑	Φ	↓	Φ
Λειτουργικά επίπεδα C1-INH	↓	↓	Φ	↓	Φ
C3	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ
C4	↓		Φ	↓	Φ
C1q	Φ	Φ	Φ	↓ (75%)	Φ

Κλινικά και συγκριτικά με το ΚΑΟ με ανεπάρκεια του C1-INH, το ΚΑΟ με φυσιολογικό C1-INH προσβάλλει συνήθως γυναίκες και τα επεισόδια ΑΟ συνοδεύουν συνήθως καταστάσεις με αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων όπως π.χ. η κύηση ή η θεραπεία με οιστρογόνα. Επίσης έχει καθυστερημένη ηλικία έναρξης (άνω των 20 ετών κατά μέση τιμή), προσβάλλει λιγότερο το πεπτικό, περισσότερο τη γλώσσα και μπορεί να υπάρχουν μακρές περίοδοι χωρίς κρίσεις. Η εξέταση μεγάλων γενεαλογικών δέντρων σε οικογένειες με ΚΑΟ χωρίς ανεπάρκεια C1-INH υποδεικνύει αυτοσωματικό τύπο κληρονομικότητας. Συγκριτικά με το ΚΑΟ με ανεπάρκεια C1-INH, ο τρόπος κληρονομικότητας εμφανίζει ποικίλη και κάποιες φορές χαμηλή διεισδυτικότητα (penetrance) με ασυμπτωματικούς φορείς στην πάσχουσα οικογένεια, συνήθως άντρες.¹¹⁵

Διακρίνουμε δύο μορφές ανάλογα με το αν ανιχνεύεται (σπανιότερα) μετάλλαξη στο γονίδιο του *FXII* ή μη, χωρίς ωστόσο να έχει βρεθεί μεταξύ τους διαφορά στην κλινική εικόνα.¹¹⁵ Τρεις μεταλλάξεις του γονιδίου *FXII* έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις η αιτιολογία παραμένει άγνωστη. Η μία μετάλλαξη οδηγεί σε αντικατάσταση της θρεονίνης με αργινίνη (Thr309Arg) και η άλλη σε αντικατάσταση της θρεονίνης με λυσίνη (Thr309Lys).¹¹⁷ Η τρίτη αφορά μια έλλειψη 72bp (c.971_1018+24del72*¹¹⁸). Πιο συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις, οι οποίες περιεγράφηκαν, βρίσκονται στην πλούσια σε προλίνη περιοχή του *FXII*. Αυτή η περιοχή, φαίνεται ότι παίζει κάποιο

ρόλο στην πρόσδεση του FXII σε αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες, μέσω των οποίων ενεργοποιείται. Προτείνεται ότι οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν τους μηχανισμούς της ενεργοποίησης του FXII με επαφή με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η ενεργοποίησή του (gain-of-function mutation). Όπως αναφέρθηκε, ο τύπος αυτός του ΚΑΟ επηρεάζεται από το ορμονικό σύστημα και είναι γνωστή η επίδραση των οιστρογόνων στον υποκινητή του γονιδίου *F12*.^{119, 120}

Θεραπευτικά δεν υπάρχουν τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες, αλλά σε αναφορές περιπτώσεων φαίνεται ότι έχουν αποτελεσματικότητα τα ανδρογόνα και τα αντινωδογονολυτικά για την προφυλακτική αγωγή, όπως και ο rdC1-INH και η ικατιμπάντη σε κρίσεις ΑΟ.

2.9.2 Επίκτητο αγγειοοίδημα με ανεπάρκεια του C1-INH – ΕΑΟ (acquired angioedema - ΑΑΕ)

Το ΕΑΟ είναι μία ακόμη μορφή αγγειοοιδήματος χωρίς κνίδωση με συχνότητα 1:100.000- 1:500.000 . Είναι σπανιότερο από το ΚΑΟ και αναλογεί περίπου ένας ασθενής με ΕΑΟ για κάθε 10 ασθενείς με ΚΑΟ. Χαρακτηρίζεται από **επίκτητη ανεπάρκεια του C1-INH** με αποτέλεσμα, όπως και στο ΚΑΟ, την ενεργοποίηση της κλασσικής οδού του συμπληρώματος και του συστήματος επαφής με συνέπεια επαναλαμβανόμενες κρίσεις ΑΟ.¹²¹ Εμφανίζεται συνήθως μετά τα 40 έτη, δεν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό και η κλινική του εικόνα δε διαφέρει από το ΚΑΟ. Εργαστηριακά έχουμε μειωμένο C4 και μειωμένα αντιγονικά και λειτουργικά επίπεδα C1-INH όπως φαίνεται στον Πίνακα 2. Το C1q είναι μειωμένο στο 75% των ασθενών με ΕΑΟ και σχεδόν ποτέ στο ΚΑΟ. Στο ΕΑΟ δεν ανιχνεύεται γονιδιακή μετάλλαξη στο *SERPING1*. Επίσης σε μεγάλο ποσοστό ασθενών ανιχνεύονται αντισώματα έναντι του C1-INH.¹²²

Στην αρχή το ΕΑΟ συσχετίστηκε με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Ο πρώτος ασθενής έπασχε από λέμφωμα. Θεωρήθηκε ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιούν συνεχώς το συμπλήρωμα με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια του C1-INH λόγω υπερκατανάλωσης.^{123, 124} Ονομάστηκε έτσι ΕΑΟ τύπου I, ώστε να διακριθεί από τον μεταγενέστερο ΕΑΟ τύπου II, όπου κυκλοφορούν αδρανοποιούντα αντισώματα έναντι του

C1-INH σε υγιή συνήθως άτομα αλλά και σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα.^{125, 126} Τα αντισώματα αυτά στρέφονται εναντίων επιτόπων στο ενεργό κέντρο του μορίου της πρωτεΐνης και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του C1-INH και την εκδήλωση της νόσου.¹²⁵⁻¹²⁸

Μεταγενέστερες μελέτες αναζήτησης αυτών των αυτοαντισωμάτων έδειξαν ότι η προηγούμενη διάκριση του ΕΑΟ δεν ήταν ακριβής. Φάνηκε ότι οι περισσότεροι ασθενείς με ΕΑΟ είχαν αυτοαντισώματα έναντι του C1-INH, ακόμη και αυτοί με ΕΑΟ τύπου Ι.¹²⁹ Σήμερα λοιπόν πιστεύεται ότι το ΕΑΟ είναι μία κατάσταση με διαταραγμένο πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων με παραγωγή αυτοαντισωμάτων, το δε εύρος της βλάβης εκτείνεται από την αυτοαντιδραστικότητα έως την κακοήθη λεμφοϋπερπλαστική νόσο.¹²² Συγκεκριμένα σε αρκετούς ασθενείς με ΕΑΟ ανευρίσκεται μονοκλωνική γαμμαπάθεια αγνώστου σημασίας (monoclonal gamopathy of uncertain significance – MGUS που συνιστά το συχνότερο αίτιο), χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, non-Hodgkin λέμφωμα και πολλαπλούν μύελωμα.¹³⁰ Σε κάποιες περιπτώσεις δεν ανευρίσκεται διαταραχή, ενώ σε κάποιες άλλες διαγιγνώσκονται άλλες νεοπλασίες ή συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος.¹³¹⁻¹³⁴

Η θεραπεία του ΕΑΟ είναι παρόμοια με το ΚΑΟ, με διαφορά τα καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα του τραπεξαμικού στο ΕΑΟ και την υποχώρηση των κρίσεων του ΑΟ μετά την θεραπεία της υποκείμενης πάθησης στο ΕΑΟ.¹²²

2.9.3 Επίκτητο αγγειοίδημα από φάρμακα

Αφορά το ΑΟ που εμφανίζεται μετά τη λήψη φαρμάκων, κυρίως τους αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου (Angiotensin I-converting enzyme inhibitors, ACEi) και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ). Οι ACEi αποτελούν μια τάξη φαρμάκων, η οποία χρησιμοποιείται παγκοσμίως σε πάνω από 40 εκατομμύρια ασθενείς για τη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως η υπέρταση, η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και ο διαβήτης. Παρενέργειες των ACEi είναι ο βήχας, το αγγειοίδημα, οι αναφυλακτοειδείς αντιδράσεις κατά την αιμοκάθαρση κ.ά.

Το αγγειοίδημα από ACEi (Angioedema induced from angiotensin I-converting enzyme inhibitors, AE-ACEi) αποτελεί μια δυνητικά θανατηφόρα επιπλοκή των ACEi και επιβάλλει την άμεση διακοπή τους. Σε επιδημιολογικές μελέτες το AE-ACEi παρουσιάζεται σε ποσοστό 0.1%-0.7% σε λευκούς ασθενείς που λαμβάνουν ACEi, ενώ η μαύρη φυλή εμφανίζει 4 έως 5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο.^{135, 136} Σε προοπτικές μελέτες αναφέρεται εμφάνιση AE-ACEi σε ποσοστό 2.8-6% των ασθενών. Η φυλετική διαφορά συνηγορεί υπέρ συμμετοχής και γενετικών παραγόντων. Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι το κάπνισμα, η μεγαλύτερη ηλικία, το θήλυ φύλο και η ανοσοκαταστολή μεταμοσχευμένων νεφροπαθών και καρδιοπαθών. Αντίθετα προστατευτικά φαίνεται να επιδρά η παρουσία σακχαρώδη διαβήτη.¹³⁷⁻¹³⁹

Κλινικά η εκδήλωση του ΑΟ αφορά συχνά την περιοχή του προσώπου (παρειά, χείλη, γλώσσα) αλλά μπορούν να προσβληθούν και άλλες περιοχές του δέρματος ή ο λάρυγγας ή σπανιότερα το γαστρεντερικό.¹⁴⁰ Η προσβολή του λάρυγγα αποτελεί την πιο επικίνδυνη και δυνητικά θανατηφόρα επιπλοκή, όπως και στο ΚΑΟ. Το ΑΟ μπορεί να εμφανισθεί από τις πρώτες μέρες χρήσης των ACEi έως και έτη μετά την έναρξή τους (έχουν περιγραφεί ως και 10 έτη). Το AE-ACEi εμφανίζεται συνήθως στο πρώτο εξάμηνο, ενώ σε ένα ποσοστό 27% η έναρξη καθυστερεί και πέραν του εξαμήνου.^{138, 139, 141-143} Το AE-ACEi δεν ανταποκρίνεται καθόλου ή ελάχιστα στη χρήση αντιϊσταμινικών, κορτικοστεροειδών ή αδρεναλίνης. Η προσβολή του λάρυγγα μπορεί να οδηγήσει σε διασωλήνωση ή τραχειοτομία. Σε μια πρόσφατη κλινική μελέτη φάνηκε ότι η ικατιμπάντη προσφέρει θεραπευτική ωφέλεια σε ασθενείς με AE-ACEi.¹⁴⁴ Όταν γίνει διάγνωση του AE-ACEi, απαιτείται η απαγόρευση χρήσης της ομάδας των ACEi.

Παρατηρούμε ότι το AE-ACEi ομοιάζει περισσότερο με τους κλινικούς χαρακτήρες του ΚΑΟ και μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν **τον κεντρικό ρόλο της ΒΚ στο AE-ACEi**. Σε μελέτες μέτρησης της ΒΚ στο πλάσμα σε ασθενείς με AE-ACEi βρέθηκε υψηλή τιμή ΒΚ, δυστυχώς όμως ο αριθμός των ασθενών ήταν μικρός.¹⁴⁵ Επιπρόσθετα ο ρόλος της ΒΚ ενισχύεται από πρόσφατη μελέτη όπου φάνηκε η θεραπευτική ικανότητα της ικατιμπάντης στη αντιμετώπιση των κρίσεων AE-ACEi.¹⁴⁴ Ενώ στο ΚΑΟ απομονώνονται προϊόντα αποδόμησης του ΗΜWΚ, του μητρικού μορίου της ΒΚ, κάτι αντίστοιχο δε συμβαίνει στο AE-ACEi.¹⁴⁶ Έτσι στο AE-ACEi, η αυξημένη συγκέντρωση ΒΚ **φαίνεται να οφείλεται σε**

μειωμένο καταβολισμό του πεπτιδίου της BK και όχι στην αυξημένη παραγωγή του, όπως συμβαίνει στο ΚΑΟ.

Ο καταβολισμός του πεπτιδίου της BK γίνεται, όπως θα αναφερθεί αναλυτικά, από τις εξής μεταλλοπεπτιδάσες: α) Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης, ACE (EC 3.4.15.1), β) Αμινοπεπτιδάση P, Aminopeptidase P, APP (EC 3.4.11.9), γ) Νεπριλυσίνη, Nephilysin, NEP (EC 3.4.24.11), δ) Καρβοξυπεπτιδάση N, Carboxypeptidase N, CPN (EC 3.4.17.3) (kininase I), ε) Διπεπτιδυλ-πεπτιδάση IV, Dipeptidyl peptidase IV, DPPIV (EC 3.4.14.5) (Εικόνα 25).⁵⁰ Επί φυσιολογικών συνθηκών ο καταβολισμός της BK και της des-Arg-BK (το προϊόν της διάσπασης BK από την CPN και κύριο αγωνιστή των B1 βραδυκινεργικών υποδοχέων - B1R) πραγματοποιείται μέσω του ACE και του APP. Υπό ACEi αναστολή, τα υπόλοιπα ένζυμα εκτός ACE (APP, CPN, NEP, DPPIV) αναλαμβάνουν ρόλο. Η APP αναλαμβάνει σημαντικό ρόλο για τον καταβολισμό τόσο της παραγόμενης BK, όσο και des-Arg-BK.¹⁴⁶ Η CPN (kininase I) μεταβολίζει φυσιολογικά το 3.5% της BK σε des-Arg-BK. Υπό ACEi αναστολή το ποσοστό αυτό πολλαπλασιάζεται και το 28% της BK μεταβολίζεται σε des-Arg-BK με τελικό αποτέλεσμα ο χρόνος ημίσειας ζωής της BK και της des-Arg-BK να αυξάνει κατά εννιά και δύο φορές αντίστοιχα.¹⁴⁷

Οι Molinaro et al. έδειξαν ότι συγκριτικά με τους μάρτυρες τα άτομα με ACEi - AE παρουσίαζαν παρόμοια παραγωγή και καταβολισμό BK αλλά μεγαλύτερη παραγωγή και μειωμένο καταβολισμό des-Arg-BK και έτσι θεώρησαν πιθανό ότι υπάρχει λειτουργικό έλλειμμα σε ένα μη-ACE, μη-κινινάση I ένζυμο, υποδεικνύοντας την APP.¹⁴⁶ Σε άτομα με AE-ACEi συγκριτικά με δείγμα μαρτύρων που λάμβαναν ACEi χωρίς εμφάνιση ΑΟ, οι Adam et al. μέτρησαν μειωμένη δραστηριότητα του APP και παρόμοια της CPN.¹⁴⁸ Και οι Duan et al. βρήκαν ότι ο πολυμορφισμός -2399C>A (rs3788853) στο εξόνιο 6 του *XPNPEP2* (το γονίδιο της APP) συσχετιζόταν σημαντικά με χαμηλή APP δραστηριότητα και παρουσία AE-ACEi.¹⁴⁹

Σε αντίθεση με τον προηγούμενο θετικό ρόλο του APP, οι Byrd et al. βρήκαν παρόμοια την δραστηριότητα του APP και τον χρόνο ημίσειας ζωής της des-Arg-BK, μεταξύ ασθενών με AE-ACEi και μαρτύρων.¹⁵⁰ Η μειωμένη δραστηριότητα της APP παρατηρείται στο 18% του γενικού πληθυσμού, ποσοστό σημαντικά μεγαλύτερο της συχνότητας του AE-ACEi και αυτό συνεπάγεται ότι ένα σημαντικό αριθμός ασθενών με χαμηλή APP λαμβάνουν

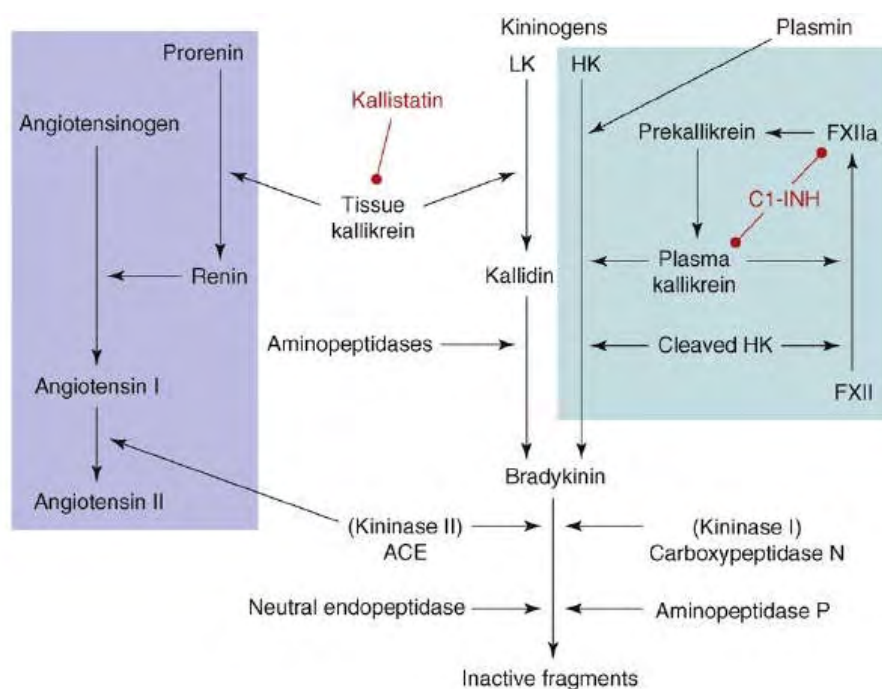
ACEi χωρίς να παρουσιάζουν αγγειοίδημα. Επίσης σε έγχρωμους με AE-ACEi, οι οποίοι έχουν πολλαπλάσιο κίνδυνο από τη λευκή φυλή, δεν ανιχνεύθηκαν μειωμένες τιμές APP.^{149, 151} Όλα αυτά συνηγορούν υπέρ μιας πολυπαραγοντικής αιτιολογίας και ότι η μειωμένη δραστηριότητα του APP μπορεί να δικαιολογήσει ένα τμήμα των περιστατικών με AE-ACEi.

2.9.4 Επίκτητο ιδιοπαθές αγγειοίδημα

Οι ασθενείς με φυσιολογικό C4 και C1-INH, χωρίς οικογενειακό ιστορικό, χωρίς να λαμβάνουν A-MEA και εφόσον έχουν αποκλεισθεί οι γνωστές αίτιες ΑΟ ταξινομούνται στο ιδιοπαθές ΑΟ. Ανάλογα με την ύπαρξη ή μη ανταπόκρισης σε υψηλές δόσεις αντιισταμινικών, το ιδιοπαθές ΑΟ διακρίνεται σε ισταμινεργικό ή μη-ισταμινεργικό, σε μια προσπάθεια να περιγραφεί ο υποκείμενος μηχανισμός.¹

3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ - ΚΙΝΙΝΩΝ

Το KKS αποτελεί έναν πολύπλοκο ενζυμικό «καταρράκτη» ο οποίος, όταν ενεργοποιηθεί, οδηγεί στην απελευθέρωση αγγειοδραστικών κινινών. Περιλαμβάνει τις πρωτεάσες σερίνης, ιστική καλλικρεΐνη (TK) και KL, οι οποίες αντίστοιχα διασπούν το χαμηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (low molecular weight kininogen - LMWK) και το ΗΜWΚ, απελευθερώνοντας κινίνες. Εν συνεχεία οι κινίνες ασκούν τη φαρμακολογική δράση τους με την ενεργοποίηση ειδικών υποδοχέων, πριν μεταβολισθούν από ειδικές πεπτιδάσες (Εικόνα 14).⁵⁰



Εικόνα 14. Αναπαράσταση του KKS. Το KKS με το σκέλος της στο πλάσμα (το CS, FXII + ΗΜWΚ + KL – περιοχή με μπλε ανοιχτό) και στους ιστούς (LMWK + KD) από Cugno et al.²⁰ Επίσης φαίνεται η σημαντική θέση που έχει το ACE στο σταυροδρόμι των συστημάτων ρενίνης – αγγειοτενσίνης (μωβ περιοχή) και του KKS, με την παραγωγή αγγειοτενσίνης II από αγγειοτενσίνη I και την αποδόμηση της BK αντίστοιχα.

Το KKS, το οποίο λειτουργεί στο πλάσμα, αποτελεί το λεγόμενο **CS** και περιλαμβάνει: i) τον παράγοντα Hageman (Factor XII - FXII), ii) την προκαλλικρεΐνη

(prekallikrein - PK) με την ενεργή μορφή της την KL, iii) το HMWK, με τελικό δραστικό μεσολαβητή τους συστήματος τη BK.¹⁵² Η ενεργοποίηση του FXII σε FXIIa, οδηγεί στη διάσπαση της PK σε KL. Η KL επιδρά: α) στο HMWK παράγοντας τον κύριο αγγειοδιασταλτικό πεπτίδιο την BK και β) ενεργοποιεί παλίνδρομα τον FXII με θετική ανατροφοδότηση, όπως φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 14.

3.1 Παράγοντας Hageman (Factor XII- FXII)

Ιστορικό υπόβαθρο

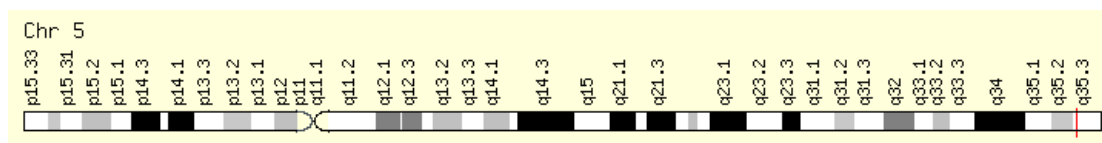
Το 1955 ο Oscar Ratnoff και ο Joan Colony περιέγραψαν έναν ασθενή 37 ετών, τον John Hageman, ο οποίος είχε παρατεταμένο τον χρόνο πήξης του αίματος. Ο ασθενής δεν είχε όμως αιμορραγικά επεισόδια, αν και είχε εξαιρετικά παρατεταμένο χρόνο πήξης του αίματος σε γυάλινους σωλήνες ή σε σωλήνες με επίστρωση σιλικόνης.¹⁵³ Ο Oscar Ratnoff κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο ασθενής του είχε ανεπάρκεια σε έναν παράγοντα πήξης, άγνωστο μέχρι τότε, τον οποίο και ονόμασε παράγοντα Hageman, από το όνομα του ασθενούς (αργότερα έγινε γνωστός ως Factor XII - FXII). Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι ο FXII κυκλοφορεί στο αίμα ως ένα ανενεργό πρόδρομο ζυμογόνο και όταν ενεργοποιείται, καθίσταται ικανός να ενεργοποιεί τον FXI.¹⁵⁴

Το γονίδιο του FXII

Το γονίδιο *F12* βρίσκεται στο μακρύ (q) βραχίονα του χρωμοσώματος 5 στη θέση 5q35.3, από το ζεύγος βάσεων 177.402.137 μέχρι το ζεύγος βάσεων 177.416.523 (Εικόνα 15). Το γονίδιο *F12* έχει μήκος 12kb και αποτελείται από 13 ιντρόνια και 14 εξόνια. Αρχικά χαρτογραφήθηκε με την μέθοδο Southern και στη συνέχεια με *in situ* υβριδισμό.¹⁵⁵

Αναφορικά με τη ρύθμιση της έκφρασης του *F12* είναι λίγα γνωστά. Το *F12* χαρακτηρίζεται από ρυθμιστικές περιοχές στον υποκινητή οι οποίες αλληλοεπιδρούν με οιστρογόνα (hormone response element - HRE), ενώ είναι γνωστό ότι η θεραπεία με οιστρογόνα αυξάνει την παραγωγή του ηπατικού FXII.¹⁵⁶ **Ο κύριος αναστολέας της**

δράσης του FXIIa είναι ο C1-INH, υπεύθυνος για την αναστολή του στο πλάσμα σε ποσοστό μεγαλύτερο >90%.¹⁵⁷



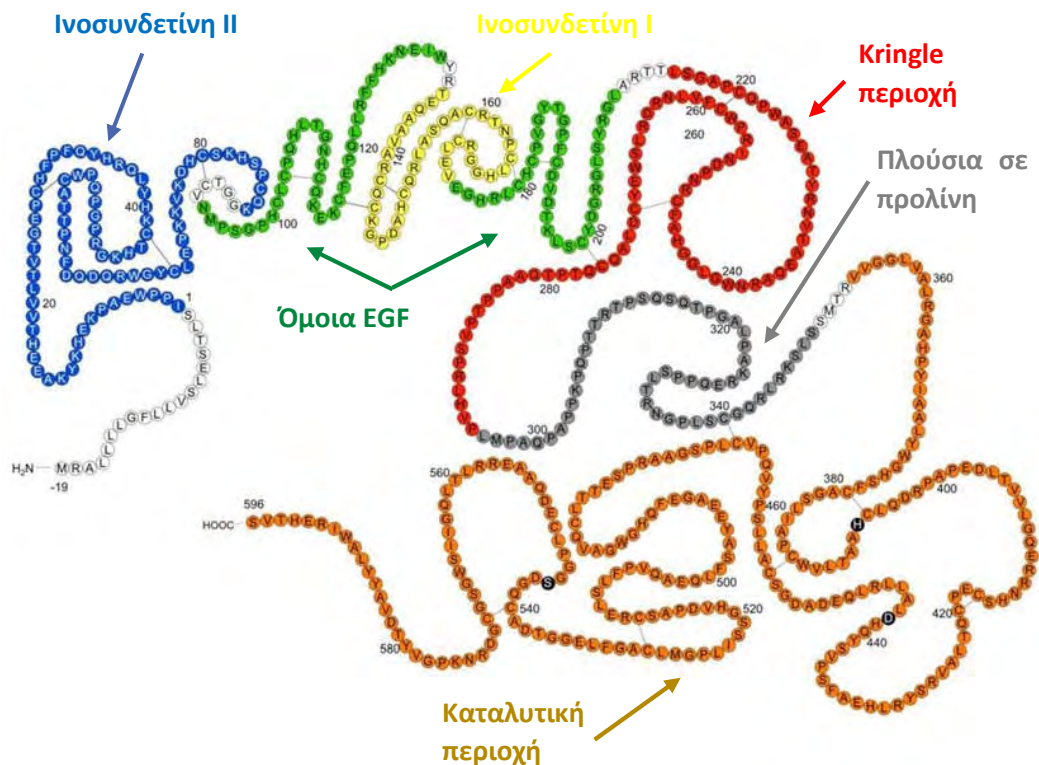
Εικόνα 15. Η θέση του γονιδίου F12 στο χρωμόσωμα 5 (από <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=F12&keywords=f12>).

Δομή του FXII

Το ζυμογόνο FXII παράγεται και εκκρίνεται από το ήπαρ. Αποτελείται από μια βαριά αλυσίδα (353 κατάλοιπα) και μία ελαφριά αλυσίδα (243 κατάλοιπα) που συγκρατούνται μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού. Ο FXII αποτελείται από πολλές δομικές περιοχές (Εικόνα 16). Ξεκινώντας από το N-τελικό άκρο, περιλαμβάνει: 1) ένα πεπτίδιο οδηγό, 2) μία περιοχή ινοσυνδετίνης τύπου II, 3) μία ομόλογη του EGF (epidermal growth factor) επικράτεια, 4) μία επικράτεια ινοσυνδετίνης τύπου I, 5) μία δεύτερη ομόλογη του EGF επικράτεια, 6) μία επικράτεια Κρινγκλ (domain Kringle, έλαβε αυτήν ονομασία λόγω ομοιότητας με αρτοποιήματα Σκανδιναβικής προέλευσης), 7) μία περιοχή πλούσια σε προλίνη και 8) μία καταλυτική περιοχή (Εικόνα 16). Όλες αυτές οι περιοχές είναι ομόλογες με περιοχές που βρίσκονται σε άλλες πρωτεάσες σερίνης, εκτός από την πλούσια σε προλίνη περιοχή, η οποία είναι μοναδική για τον FXII. Οι περιοχές του FXII περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω, ενώ συνοπτικά οι δομικές περιοχές του FXII και ο μέχρι τώρα γνωστός βιολογικός ρόλος τους αναφέρονται στον Πίνακα 3.

Περιοχή ομόλογη με την ινοσυνδετίνης τύπου II .

Το N-τελικό άκρο του FXII εμφανίζει κοινή αλληλουχία με τις ομόλογες τύπου II επικράτειες της ινοσυνδετίνης, οι οποίες αποτελούν τη θέση δέσμευσης της ινοσυνδετίνης στο κολλαγόνο.¹⁵⁸ Οι περιοχές αυτές μπορεί να είναι υπεύθυνες για την



Εικόνα 16. Δομή του FXII τροποποιημένο από Stavrου E. et al. ¹⁵⁹

ικανότητα σύνδεσης του FXII σε τεχνητές επιφάνειες.¹⁶⁰ Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση, μία θέση δέσμησης σε αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες έχει χαρτογραφηθεί στο N-τελικό άκρο του FXII, αποτελούμενη από τα κατάλοιπα 1-28, που βρίσκονται στην περιοχή ιγοςυνδετίνης τύπου II,^{161, 162} και τα κατάλοιπα 134-153 που βρίσκονται στην περιοχή ιγοςυνδετίνης τύπου I (Πίνακας 3).¹⁶³ Ανάλυση της δομής και της λειτουργίας του ανθρώπινου FXII με κατευθυνόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου, επιβεβαίωσε **ότι το N-τελικό άκρο του FXII περιέχει μία θέση δέσμησης για αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες**. Επιπρόσθετα η περιοχή ιγοςυνδετίνης τύπου II του FXII περιέχει και μία θέση δέσμησης για τον FXI που εκτείνεται από τα αμινοξέα 3 ως 19 (Πίνακας 3).¹⁶⁴

Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης σε διάλυμα, ο FXII έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με ενδοθηλιακά κύτταρα, ουδετερόφιλα και αιμοπετάλια.^{165, 166, 167} Στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο FXII αλληλοεπιδρά με τον uPAR, τον gC1qR και την CK1,

οι ίδιοι υποδοχείς στους οποίους δεσμεύεται το ΗΜWΚ. Στα αιμοπετάλια ο FXII συνδέεται με το σύμπλοκο GPIIb-IX-V.¹⁵⁹

Ομόλογες του EGF επικράτειες

Δύο επικράτειες του παράγοντα FXII είναι ομόλογες με τον EGF. Η αλληλουχία αυτή έχει βρεθεί σε πολλές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού τύπου 1 (transforming growth factor type 1, TGF-1), του tPA, του uPA και αρκετών παραγόντων πήξης. Σε κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες, υπάρχει μια εξαιρετικά διατηρημένη περιοχή 50 αμινοξέων με εννέα αμετάβλητα κατάλοιπα κυστεΐνης και γλυκίνης.¹⁶⁸ Ο EGF έχει γνωστή μιτογόνο δράση σε ποικιλία κυττάρων μέσω της αυτοφωσφορυλίωσης του υποδοχέα του και εν συνέχεια της φωσφορυλίωσης υπολειμμάτων τυροσίνης σε ενδοκυττάρια πρωτεΐνες όπως της οδού MAPK/ERK (mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase).

Επικράτεια ινοσυνδεΐνης τύπου I

Η επικράτεια ινοσυνδεΐνης τύπου I χωρίζει τις δύο ομόλογες του EGF επικράτειες και είναι ένα πεπτίδιο 43 αμινοξέων, το οποίο έχει περιορισμένη ομολογία με την ινοσυνδεΐνη τύπου I. Η ακριβής λειτουργία της δεν είναι γνωστή, αλλά έχει χαρακτηριστεί ότι συμμετέχει στην δέσμευση σε τεχνητή επιφάνεια.¹⁶⁹

Επικράτεια Κρινγκλ (Kringle domain)

Άλλη μία ομόλογη περιοχή που βρέθηκε στον FXII είναι η επικράτεια Κρινγκλ. Οι επικράτειες Κρινγκλ τυπικά είναι 80 αμινοξέα σε μήκος με τρεις χαρακτηριστικούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι επικράτειες Κρινγκλ μεταξύ του FXII και του tPA έχουν περίπου 41% ομολογία. Η λειτουργία της περιοχής αυτής στον FXII δεν είναι γνωστή, αλλά έχει προταθεί ως πιθανή θέση πρόσδεσης σε τεχνητή επιφάνεια.¹⁵⁹

Περιοχή πλούσια σε προλίνη

Την επικράτεια Κρινγκλ ακολουθεί μία περιοχή στην οποία το 33% των καταλοίπων είναι προλίνη, η οποία όμως δε μοιράζεται καμία ομολογία αλληλουχίας με

άλλες πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη. Η σημασία της συγκεκριμένης περιοχής στον FXII δεν έχει ακόμη καθορισθεί.¹⁵⁹

Καταλυτική επικράτεια

Η καταλυτική επικράτεια του FXII είναι η μεγαλύτερη και η καλύτερα μελετημένη περιοχή της πρωτεΐνης. Το ενεργό κέντρο του FXIIa (είναι η ενεργοποιημένη μορφή του FXII) αποτελείται από 3 αμινοξέα: το H394, το D442 και το S544, υποδεικνύοντας ότι *in vivo* το καταλυτικό κέντρο είναι σφαιρικό φέρνοντας τα τρία υπολείμματα σε κοντινή παράθεση. Η πρωτεολυτική διάσπαση στη θέση R353-V354 μετατρέπει την μία και ενιαία αλυσίδα του ζυμογόνου FXII (80 kDa) στον FXIIa. *In vivo* ο FXIIa κυκλοφορεί ως πρωτεΐνη δύο αλυσίδων, μία βαριά αλυσίδα των 50 kDa (353 κατάλοιπα) και μια ελαφριά αλυσίδα των 30 kDa (243 κατάλοιπα), οι οποίες συγκρατούνται μαζί από ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ δύο κυστεϊνών. Η αναγωγή αυτού του δισουλφιδικού δεσμού ελευθερώνει την ελαφριά αλυσίδα του FXIIa ως β-FXIIa (ή HFf).^{170, 171} Αν και ο β-FXIIa διατηρεί την πρωτεολυτική δραστηριότητα έναντι των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, δηλαδή να ενεργοποιεί το CS, δεν είναι σε θέση να συνδέεται με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες και συνεπώς να επάγει την πήξη.¹⁷²⁻¹⁷⁶

3.1.1 Ενεργοποίηση του συστήματος επαφής

Γνωρίζουμε ότι **στις κρίσεις του ΚΑΟ το CS είναι ενεργοποιημένο**, δε γνωρίζουμε όμως ποια είναι εκείνα τα φαινόμενα που οδηγούν στην ενεργοποίηση του FXII και CS *in vivo* (Εικόνα 14). Γνωστός μηχανισμός εκκίνησης είναι η αυτενεργοποίηση του FXII κατά τη σύνδεσή του με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες. Η σύνδεση αυτή προκαλεί αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του μορίου και διευκολύνει την ενεργοποίησή του.^{177, 178} Τέτοιες τεχνητές επιφάνειες είναι το γυαλί, η καολίνη, το ελλαγικό οξύ, το σουλφατίδιο, τα μικκύλια, η υψηλού μοριακού βάρους θειϊκή δεξτράνη, το υπογαλλικό βισμούθιο, το πολυαιθυλένιο, το λάστιχο σιλικόνης και διάφορα πολυμερή. Από την άλλη πληθώρα βιολογικών ουσιών ενεργοποιούν τον FXII όπως ο αρθρικός χόνδρος, το δέρμα, τα λιπαρά οξέα, η ενδοτοξίνη, οι κρύσταλλοι ουρικού νατρίου, το πυροφωσφορικό ασβέστιο, η L-ομοκυστεΐνη, η αιματίνη, οι πρωτοπορφυρίνες, οι ηπαρίνες, η χονδροϊτίνη, το θειικό οξύ,

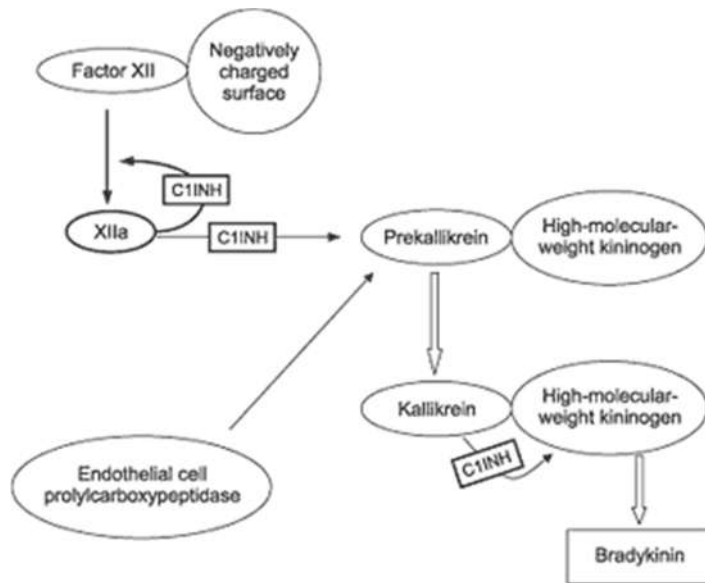
Πίνακας 3. Οι δομικές περιοχές του FXII και ο ρόλος τους (από Stavrrou E. et al) ¹⁵⁹

Επικράτειες και αλληλουχία αμινοξέων	Αλληλουχία αμινοξέων	Υπο-επικράτειες με γνωστή λειτουργική δράση και ρόλος τους	
1. Πεπτίδιο οδηγός	-12 - 1		
2. Ινοσυνδεΐνη τύπου II	1 - 88	3 - 19	Αλληλεπίδραση με FXI
		1 – 28	Περιοχή δέσμωσης σε τεχνικές επιφάνειες
		39 – 47	Περιοχή σύνδεσης σε HUVEC
		40 – 44	Περιοχή σύνδεσης ψευδαργύρου
		78 – 82	Περιοχή σύνδεσης ψευδαργύρου
3. Ομόλογη του EGF επικράτεια	94 - 131		Περιοχή σύνδεσης ψευδαργύρου
4. Ινοσυνδεΐνη τύπου I	133 - 173		Περιοχή δέσμωσης ινώδους και ηπαρίνης
		134 - 153	Περιοχή δέσμωσης σε τεχνικές επιφάνειες
5. EGF-like επικράτεια	174 – 210		Πιθανή περιοχή δέσμωσης σε τεχνικές επιφάνειες
		174 - 146	Πιθανή περιοχή δέσμωσης ψευδαργύρου
6. Επικράτεια Κρινγκλ	215 - 295		Πιθανή περιοχή δέσμωσης σε τεχνητές επιφάνειες
		193 - 276	Ίσως αυξάνει την ευαισθησία στην πέψη από KL
7. Περιοχή πλούσια σε προλίνη	296 – 349		Άγνωστη
8. Καταλυτική περιοχή	354 – 595		
		353 - 354	Περιοχή σχηματισμού του α-FXIIa
		H394, D442, S544	Καταλυτική τριάδα ενεργού κέντρου

η φωσφατιδυλοσερίνη, η φωσφατιδυλογλυκερίνη, το φωσφατιδικό οξύ και η φωσφατιδυλινοσιτόλη.¹⁵⁹

Αν και βλέπουμε λοιπόν μια σειρά από βιολογικές ουσίες να ενεργοποιούν τον FXII, πάντα υπήρχε το ερώτημα αν μια τέτοια αυτενεργοποίηση του FXII συμβαίνει in vivo σε φυσιολογικές ή παθοφυσιολογικές διεργασίες. Τα τελευταία χρόνια προέκυψε νέο ενδιαφέρον από την παρατήρηση ότι η αυτενεργοποίηση του FXII συμβάλλει στην μεγέθυνση του αρτηριακού θρόμβου.^{37, 179} Ένα υπάρχον μοντέλο in vivo ενεργοποίησης του FXII υποστηρίζει ότι στην αρχική αγγειακή βλάβη ενεργοποιείται πρώτα η εξωγενής οδός της πήξης με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ινώδους και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Στο στάδιο αυτό της ανάπτυξης του θρόμβου ο FXII δεν παίζει κάποιο ρόλο. Στη συνέχεια όμως, η συνάθροιση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων οδηγεί στην παραγωγή πολυφωσφορικού (poly-P, μια μη διακλαδισμένη αλυσίδα με 60-100 υποομάδες φωσφορικών). **Η ουσία poly-P ενεργοποιεί τον FXII** και αυτός αναλαμβάνει την επέκταση του θρόμβου μέσω της «ενδογενούς» οδού της πήξης.¹⁸⁰ Ακόμη περισσότερο η αυτενεργοποίηση μπορεί να συμβεί σε αγγειακή βλάβη από την έκθεση του FXII σε RNA κατεστραμμένων κυττάρων, σε πρωτεΐνες συσσωρευμένες και με διαταραγμένη δίπλωση (misfolded) όπως και σε κολλαγόνο που εκτίθεται μετά από ενδοθηλιακή βλάβη.^{159, 181-183} Πιθανώς η αυτενεργοποίηση του FXII in vivo μπορεί να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς άμυνας σε αγγειακό τραύμα και λοίμωξη.¹⁸⁴

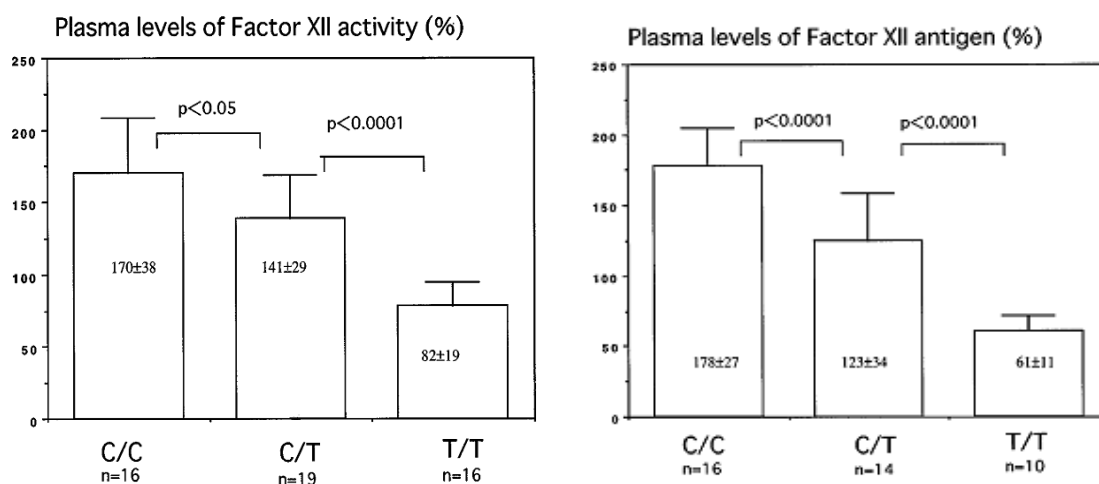
Έχουν περιγραφεί και άλλοι μηχανισμοί ενεργοποίησης του CS, **ανεξάρτητοι της αρχικής ενεργοποίησης του FXII**, μέσω της ενεργοποίησης της PK σε KL. Η PRCP (Prolylcarboxypeptidase, προλυλκαρβοξυπεπτιδάση) και η HSP-90 (heat shock protein-90) που παράγονται σε καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούν την KL και αυτή με τη σειρά τους τον FXII, χωρίς όμως να είναι γνωστό αν οι μηχανισμοί αυτοί παίζουν ρόλο in vivo (Εικόνα 17)¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Ως επισήμανση, η HSP-90 αποτελεί μια κυτταρική πρωτεΐνη που εκκρίνεται σε κυτταρικό στρες, το οποίο είναι γνωστό αίτιο των κρίσεων του ΚΑΟ.⁵⁸



Εικόνα 17. Ενεργοποίηση του συστήματος επαφής από Davis AE.¹⁸⁸ Το διάγραμμα υποδεικνύει τις δύο οδούς ενεργοποίησης του CS. Η μια, μέσω του FXII με την επαφή του με εξωγενείς αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες και η άλλη μέσω της PRCP στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.

3.1.2 Ο πολυμορφισμός C46T (rs1801020) του *F12*

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *F12* έχει δειχθεί ότι επηρεάζονται από τον πολυμορφισμό C46T (rs1801020, g.5046T>C, c.-4T>C). Ο rs1801020 βρίσκεται στην 5'-UTR περιοχή και κοντά στο κωδικίο εκκίνησης ATG του γονιδίου (4 βάσεις ανοδικά).¹⁸⁹ Έτσι η αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη δημιουργεί μία νέα θέση εκκίνησης της μετάφρασης (ATG) κοντά στην αρχική θέση εκκίνησης του γονιδίου *F12*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να **μειώνεται η μεταφραστική αποτελεσματικότητα του *F12*** και η παραγωγή της πρωτεΐνης FXII από τα ηπατοκύτταρα.¹⁹⁰ **Οι ετερόζυγοι CT και οι ομόζυγοι TT έχουν μειωμένα επίπεδα και δραστηριότητα του FXII στο αίμα συγκριτικά με τους CC** και η μείωση αυτή είναι ανάλογη της παρουσίας του T αλληλομόρφου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 18. Παρόμοια σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι ο rs1801020 του *F12* εξηγεί το 18% της διακύμανσης του FXIIa, δηλαδή ότι η δραστηριότητά του FXII βρίσκεται υπό σημαντικό γενετικό έλεγχο.¹⁹¹ Η συχνότητα του αλληλίου T σε Ευρωπαίους αναφέρεται στο 18,6%.¹⁹²



Εικόνα 18. Αντιγονικά επίπεδα και δραστικότητα του παράγοντα FXII στο πλάσμα και πολυμορφισμός C46T. Η παρουσία του T αλληλίου συνδέεται αναλογικά με μειωμένα αντιγονικά και λειτουργικά επίπεδα του FXII από Kanaji et al.¹⁸⁹

3.1.3 Κλινικές συσχετίσεις του πολυμορφισμού C46T (rs1801020) του F12

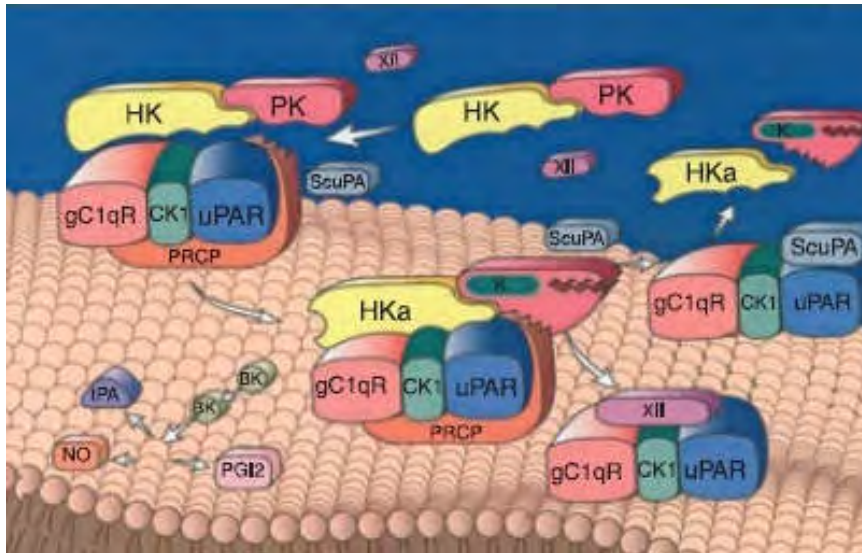
Έχει μελετηθεί ο rs1801020 σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις. Για τη σχέση του με το ΚΑΟ γίνεται αναφορά στην παράγραφο 4α μαζί με τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς της διατριβής. Η ομοζυγωτία ΤΤ φάνηκε να αυξάνει τον κίνδυνο οξέος στεφανιαίου συνδρόμου κατά έξι φορές σε Ισπανικό πληθυσμό.¹⁹³ Σε άλλη μελέτη ο γονότυπος ΤΤ, αλλά και τα χαμηλά επίπεδα του FXII στο πλάσμα, συσχετίστηκαν με στεφανιαία νόσο σε άντρες με υπερχοληστερολαιμία και οι ερευνητές το απέδωσαν σε πιθανή μειωμένη ινωδογονόλυση.¹⁹⁴ Αντίθετα, σε άλλη μελέτη η ομοζυγωτία ΤΤ φάνηκε να ασκεί προστατευτική δράση σε ασθενείς με ήδη υπάρχουσα στεφανιαία νόσο και οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι μετά τη ρήξη της αρτηριοσκληρυντικής πλάκας τα χαμηλά επίπεδα του FXII δεν ευνοούσαν την θρομβογένεση τόσο γρήγορα.¹⁹⁵ Μελέτη ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (SMILE) έδειξε συσχέτιση των χαμηλών επιπέδων FXII και αυξημένου κινδύνου εμφράγματος του μυοκαρδίου.¹⁹⁶ Ωστόσο, οι Bach et al. σε 2165 ασθενείς με στεφανιαίο νόσο επιβεβαίωσαν μεν τη συσχέτιση με τα χαμηλά επίπεδα του FXII, αλλά όχι με τον rs1801020 ή τα επίπεδα του FXIIa.¹⁹⁷ Επίσης ο rs1801020 δε συσχετίστηκε με την αβεστοποίηση των στεφανιαίων αγγείων σε υγιείς και διαβητικούς

ασθενείς.¹⁹¹ Στο ίδιο πλαίσιο και άλλες μελέτες **δε βρήκαν κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού αυτού με τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου.**¹⁹⁸⁻²⁰¹

Παράλληλα **βρέθηκε συσχέτιση του T αλληλίου με την εμφάνιση ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου,**²⁰² αλλά και με τον κίνδυνο θανάτου και την πιθανότητα μετάπτωσης του ισχαιμικού επεισοδίου σε αιμορραγικό μετά από θρομβόλυση.²⁰³ Αρχικά μελέτες έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός rs1801020, και μάλιστα ο γονότυπος TT, σχετίζεται με θρομβωτική νόσο,^{204, 205} αν και σε επόμενες μελέτες δεν υπήρξε συσχέτιση.^{206, 207} Συγκεντρωτικά σε μια μεγάλη μετα-ανάλυση (4.386 περιπτώσεις και 40.089 μάρτυρες) **δε φάνηκε να υπάρχει καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1801020 με τον κίνδυνο ανάπτυξης εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης,** αν και υπήρξε μια πολύ ασθενής συσχέτιση με το έμφραγμα του μυοκαρδίου.²⁰⁸ Επίσης ο παραπάνω πολυμορφισμός μελετήθηκε χωρίς να βρεθεί συσχέτιση, σε γυναίκες με ιδιοπαθείς καθ' έξιν αποβολές²⁰⁹⁻²¹¹ και σε ασθενείς με απόφραξη της φλέβας του αμφιβληστροειδούς, στους οποίους η υπέρταση αποτελούσε παράγοντα κινδύνου.²¹²

3.2 Καλλικρεΐνη πλάσματος (KL)

Η KL είναι μία πρωτεάση σερίνης και παράγεται στο ήπαρ ως PK, στην ανενεργή μορφή της. Στο πλάσμα το μεγαλύτερο ποσοστό της PK (80-90%) συνδέεται στοιχειομετρικά με το HMWK σε 1:1 μοριακή αναλογία, σχηματίζοντας έτσι ένα ετεροδιμερές PK – HMWK.²¹³⁻²¹⁵ Η PK συνδέεται στο ενδοθήλιο μέσω της HMWK και όχι απευθείας. Ο ενδοθηλιακός υποδοχέας για το HMWK είναι ένα τριμερές πρωτεϊνικό σύμπλεγμα αποτελούμενο από την CK1, τον gC1qR και τον uPAR (Εικόνα 19).²¹⁶⁻²²¹ Η σύνδεση του HMWK στον υποδοχέα αυτό πραγματοποιείται μέσω της βαριάς (domain 3) και της ελαφριάς αλύσου του (domain 5). Η KL αποσπά τη BK από το HMWK και ενεργοποιεί παλίνδρομα τον FXII (Εικόνα 14). Εκτός της PK υπάρχει και η ιστική καλλικρεΐνη (TK) η οποία είναι διαφορετική από την KL πλάσματος και έχει ευρεία παρουσία στους ιστούς με παρακρινική δράση.⁵⁰



Εικόνα 19. Φυσιολογική σύνδεση και ενεργοποίηση του CS από Schmaier et al.²²² Η σύνδεση του ετεροδιμερούς HMWK-PK μέσω του HMWK γίνεται στον ενδοθηλιακό τριμερή υποδοχέα gC1qR-CK1-uPAR. Η PRCP ή ο FXIIa διασπά την PK σε KL και η KL με τη σειρά της α) αποσπά από το HMWK την BK, β) ενεργοποιεί μέσω θετικής ανατροφοδότησης τον FXII σε FXIIa και γ) ενεργοποιεί την μονή αλύσου ουροκινάση ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (single-chain urokinase plasminogen activator Scu-PA). Εν συνεχεία, η BK οδηγεί στην παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO), προστακυκλίνης (PGI₂) και tPA από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

3.3 Κινογόνα (Παραγωγή κινινών)

Το **HMWK** και το **LMWK** αποτελούν τα **κινογόνα**, τα οποία διασπούν αντίστοιχα η KL και η TK, δίνοντας γένεση **στις κίνινες τη BK και την KD** (Εικόνα 14). Η BK και η KD δρουν στους B2R. Η απομάκρυνση του αμινοξέος Arg από το καρβοξυτελικό άκρο της BK και της KD μέσω καρβοξυπετιδασών δίνει τα αντίστοιχα des-Arg παράγωγα της BK και KD, τα οποία δρουν στους B1 υποδοχείς της BK (B1 receptor, B1R).^{50, 223} Στη κρίση του ΚΑΟ το σύστημα των κινινών στο πλάσμα είναι τόσο έντονα ενεργοποιημένο, ώστε με δυσκολία μετράται ακέραιο HMWK. Αντίθετα στα μεσοδιαστήματα των κρίσεων δεν υπάρχει τέτοια ενεργοποίηση σε όλους τους ασθενείς.^{56, 57, 224}

Το **HMWK** είναι μια α-σφαιρίνη, γλυκοπρωτεΐνη με έξι περιοχές με ξεχωριστές λειτουργίες. Η περιοχή 4 συνδέει την ελαφρά και την βαριά αλυσίδα και περιέχει την

αλληλουχία της BK. Η βαριά άλυσος της ΗΜWΚ (64kD) περιέχει τις περιοχές 1,2 και 3 και η ελαφρά (45kD ως 58kD) τις περιοχές 5 και 6.²²⁵ Η περιοχή 1 παρουσιάζει σύνδεση χαμηλής συγγένειας με το ασβέστιο,²²⁶ η 2 και η 3 έχουν ειδικές αλληλουχίες που αναστέλλουν τις πρωτεάσες κυστεΐνης²²⁷ και η περιοχή 3 εμφανίζει ικανότητα δέσμευσης σε αιμοπετάλια και στο ενδοθήλιο.²²⁸ Η περιοχή 5 παρουσιάζει κυτταρικές θέσεις σύνδεσης, αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες και αλληλουχίες για τη σύνδεση ηπαρίνης.²²⁹⁻²³¹ Ενώ η περιοχή 6 έχει θέση σύνδεσης της PK και του παράγοντα XI.²³²

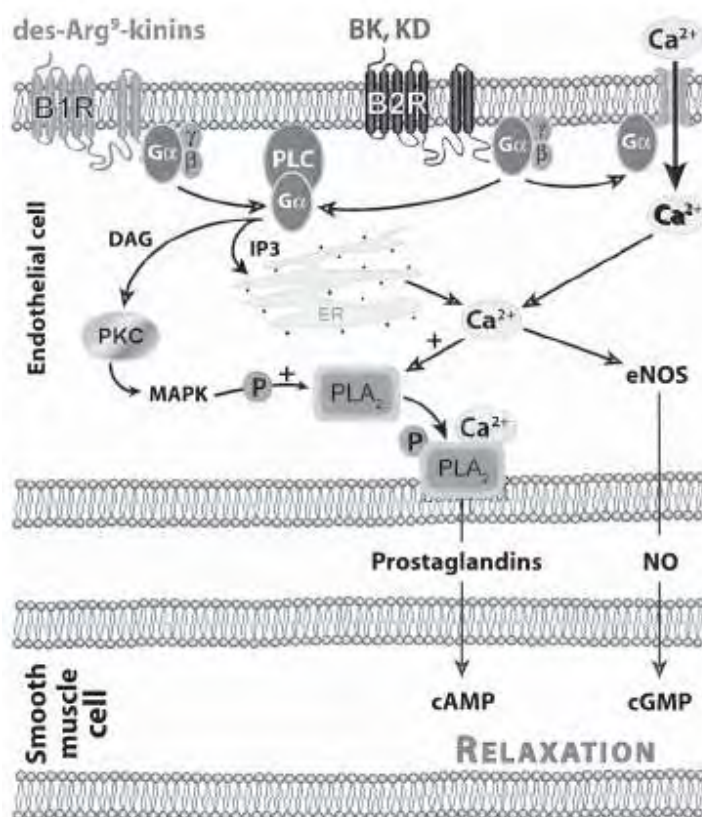
Το **LMWK** είναι μια β-σφαιρίνη του πλάσματος με μοριακή μάζα μεταξύ 50 και 68kDa.²²⁵ Έχει παρόμοια δομή με το ΗΜWΚ, αλλά διαφέρει στο ότι η ελαφρά αλυσίδα της LMWK έχει μοριακό βάρος μόνο 4 με 5kDa και απουσιάζουν οι θέσεις σύνδεσης των περιοχών 5 και 6. Κατά συνέπεια η LMWK δεν έχει τη δυνατότητα σύνδεσης της PK και ενεργοποίησης του CS.⁵⁰

3.4 Κινίνες και υποδοχείς της βραδυκινίνης (BK)

Όπως αναφέρθηκε, η **KL διασπά το ΗΜWΚ και παράγει τη BK**. Η BK, κυρίως μέσω των B2R, διεγείρει το ενδοθήλιο να παράγει NO και προσταγλανδίνη PGI₂, με αποτέλεσμα την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και αγγειοδιαστολή (Εικόνα 20). Επίσης η BK ενεργοποιεί το ινωδολυτικό σύστημα μέσω της ενδοθηλιακής παραγωγής tPA και με τη σειρά της η tPA ενεργοποιεί πρωτεάσες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ανακατασκευή της εξωκυττάριας μητρικής ουσίας. Η BK έχει φλεγμονώδη δράση με την παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων και κυτοκινών φλεγμονής,²³³ επηρεάζει την αγγειογένεση και την κυτταρική μιτογένεση.^{234, 235}

Στις κρίσεις του ΚΑΟ η BK φέρεται ως κύρια υπεύθυνη του ΑΟ. Αυτό υποστηρίζεται: α) από την ενεργοποίηση του συστήματος κινινών μόνο στις κρίσεις και όχι στα μεσοκρτικά διαστήματα, β) από τις αυξημένες τιμές BK κατά την κρίση του ΚΑΟ (πολλαπλάσια αύξηση ιδιαίτερα τοπικά στην περιοχή του ΑΟ),^{145, 236, 237} γ) από το γεγονός ότι σε C1-INH knockout ποντίκια έχουμε ΑΟ εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής BK, αφού το ΑΟ αναστέλλεται με τη χορήγηση ανταγωνιστή B2R ή με το ζευγάρι των παραπάνω ποντικών με B2R knockout ποντίκια,^{238, 239} δ) από τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα

της ικατιμπάντης του B2R ανταγωνιστή σε ασθενείς με κρίση ΚΑΟ σε κλινικές μελέτες. Ο αντίλογος που υπάρχει αφορά ότι: α) η τοπική έγχυση BK προκαλεί πόνο, κάτι που δε συμβαίνει στο ΚΑΟ,²⁴⁰ β) η BK είναι ισχυρός υποτασικός παράγοντας, όμως υπόταση δε συμβαίνει στην κρίση του ΚΑΟ και πιθανώς ο καταβολισμός του ΗΜWΚ και η παραγωγή της BK να περιορίζεται τοπικά και μόνο, στην περιοχή του ΑΟ και γ) η αποτελεσματικότητα των αντιϊνωδογονολυτικών φαρμάκων, όπως το τρανεξαμικό οξύ.

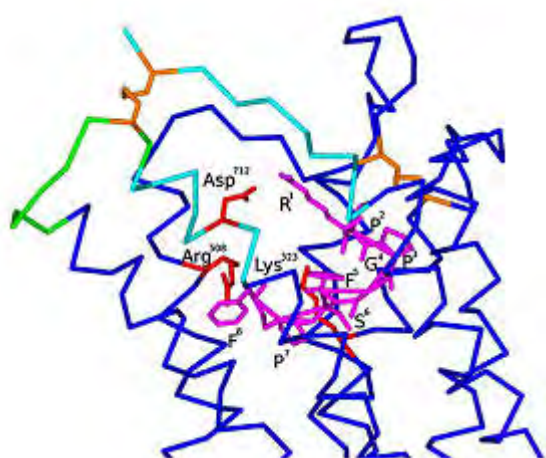


Εικόνα 20. Οι υποδοχείς κίνησης και τα μονοπάτια σηματοδότησής τους από Moreau et al.

⁵⁰ Σχηματική απεικόνιση των B1R και B2R και ο δεύτερος αγγελιοφόρος που απελευθερώνεται κατά την ενεργοποίησή τους. PLC: φωσφολιπάση C, ER: ενδοθηλιακό δίκτυο, DAG: διακυκλυκερόλη, IP3: τριφωσφορική 1,4,5 ινοσιτόλη, PLA₂: φωσφολιπάση A₂, NO: μονοξείδιο του αζώτου, eNOS: ενδοθηλιακή συνθετάση του NO.

Η BK (και η des-Arg-BK) ασκεί τις βιολογικές της επιδράσεις μέσω των B1R και B2R. Αυτοί οι δύο υποδοχείς ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (Εικόνα 21).²⁴¹ Η διάκριση των B1R και B2R γίνεται σύμφωνα με την σειρά κατάταξης της ισχύος των αγωνιστών:

- B1R (μελέτες σε αορτή κονίκλου) : des-Arg⁹-BK > Tyr (Me)⁸-BK > BK
- B2R (μελέτες σε φλέβα κουνελιού, καρωτιδική αρτηρία σκύλου, ειλεό γάτας, μήτρα αρουραίου): Tyr (Me)⁸-BK > BK > des-Arg⁹-BK.

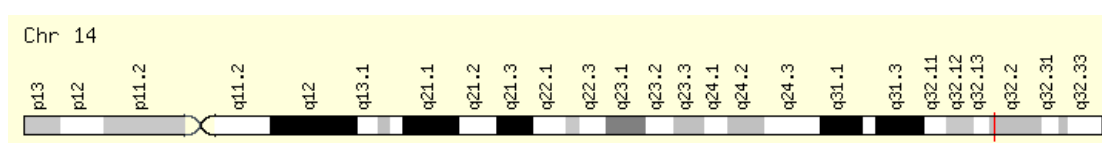


Εικόνα 21. Σχηματική τρισδιάστατη απεικόνιση της σύνδεσης της des-Arg-BK με τον υποδοχέα B1R.²⁴² Οι σκούρες μπλε περιοχές απεικονίζουν τις 7 διαμεμβρανικές έλικες του G-υποδοχέα, ενώ οι περιοχές με ανοιχτό μπλε, χρυσό και πράσινο χρώμα διαμορφώνουν το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Το πεπτίδιο της des-Arg-BK (μωβ) βρίσκεται στη θέση σύνδεσης του υποδοχέα, η οποία έχει διαμόρφωση ως «πέταλο αλόγου».

B1 υποδοχείς (B1R)

Το 1994 οι Menken *et al.* απομόνωσαν ένα cDNA που κωδικοποιεί τον B1R από ανθρώπινα εμβρυϊκά πνευμονικά κύτταρα ινοβλαστών. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης αυτού κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 353 αμινοξέων και έχει τα χαρακτηριστικά υποδοχέα που συνδέεται με G-πρωτεΐνες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Εικόνα 21).²⁴³

Παρουσιάζει κατά 36% ομολογία με τον B2 υποδοχέα. Χρησιμοποιώντας RT-PCR ανάλυση Southern blot, οι Chai *et al.* βρήκαν ότι το γονίδιο του B1R, το *BDKRB1* έχει ευρεία έκφραση στους ιστούς. Η ανάλυση Northern blot προσδιόρισε ώριμο mRNA (1,7 έως 1,8-kb) στους νεφρούς και στο πάγκρεας.²⁴³ Οι Bachvaron *et al.* έδειξαν ότι το γονίδιο του *BDKRB1* περιέχει 3 εξόνια, εκ των οποίων τα δύο πρώτα περιέχουν μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες. Μια περιοχή TATA υπάρχει στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του εξονίου 1 (5-untranslated region, 5-UTR).²⁴⁴ Με *in situ* υβριδισμό, οι Chain *et al.* χαρτογράφησαν το *BDKRB1* γονίδιο στο χρωμόσωμα 14q32.1-q32.2, σε στενή γειτνίαση με το γονίδιο του υποδοχέα B2 (Εικόνα 22).²⁴⁵



Εικόνα 22. Η θέση του γονιδίου *BDKRB1* στο χρωμόσωμα 14 (από <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BDKRB1>)

Η έκφραση των B1R αυξάνεται σε ιστική φλεγμονή. Συνήθως, οι υποδοχείς δεν εκφράζονται φυσιολογικά από τους ιστούς και επάγονται κάτω από την επίδραση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων.²⁴⁶ Έχει παρατηρηθεί επαγωγή της μεταγραφής τους από την IL-1 στους ινοβλάστες,²⁴⁷ αν και δεν αποκλείεται οι B1R να εκφράζονται ιδιοσυστατικά σε μερικά όργανα όπως οι νεφροί.^{248, 249} Στον παρακάτω Πίνακα 4 αναφέρονται αναλυτικά το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των B1R υποδοχέων στους διάφορους ιστούς και στον Πίνακα 5 συγκεντρωτικά οι πληροφορίες για τον B1R.

B2 υποδοχέας(B2R)

Ο B2R αποτελεί μια πρωτεϊνική αλυσίδα που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη 7 φορές. Το γονίδιο *BDKRB2* του υποδοχέα βρίσκεται στη θέση 14q31.1-q32.2 σε κοντινή απόσταση από το γονίδιο *BDKRB1* και απόσταση 12kb DNA να μεσολαβεί μεταξύ τους. Ο B2R αποτελείται από 391 αμινοξέα και το *BDKRB2* παρουσιάζει 3 εξόνια.

Πίνακας 4. Ιστοί και συστήματα που παίζουν ρόλο οι B1R ²⁵⁰

Γαστρεντερικός λείος μυς	Χαλάρωση ή συστολή των μυών καθώς και απελευθέρωση μεσολαβητών όπως οι προσταγλαδίνες ή οι νευροδιαβιβαστές. ²⁵⁰
Μεταφορέας ιόντων των επιθηλιακών κυττάρων	Συμβολή σε καταστάσεις όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. ^{251, 252} Διέγερση της έκκρισης χλωρίου στον ειλεό μέσω των υποδοχέων BK του βλεννογόνου. ^{253, 254}
Ουρογεννητικό σύστημα	Σύσπαση της ουροδόχου κύστης. ²⁵⁵ Διέγερση των συμπαθητικών νεύρων. Αύξηση της λειτουργίας των σπειραματικών σωληναρίων.
Αναπνευστική οδός	Βρογχόσπασμος ²⁵⁶
Ομοιόσταση του κυκλοφορικού	Είτε συστολή, είτε διαστολή των λείων μυών των αγγείων μέσω της απελευθέρωσης ενδιάμεσων μεσολαβητών όπως οι προσταγλαδίνες ή οι ενδοθηλιακοί παράγοντες (όπως το NO). ²⁵⁰
Κυτταρική ανάπτυξη και μίτωση	Μιτογόνο δράση σε μυϊκά κύτταρα. Σε ινοβλάστες εμβρυϊκού πνεύμονα προάγουν τον σχηματισμό του κολλαγόνου, την κυτταρική διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό. ²⁵⁷
Φλεγμονή	Οι B1R επάγονται ως απάντηση στη βλάβη κάποιου ιστού ή σε άλλους παράγοντες της φλεγμονώδους απόκρισης όπως είναι οι κυτοκίνες. ²⁵⁸ Παίζουν ρόλο σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, όπως η περιοδοντίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η οστεομυελίτιδα. ²⁵⁹

Πίνακας 5. Συγκεντρωτικές πληροφορίες για τους B1R

(http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/RBI_Handbook/sg_ls_cs_rbibo ok_bradyk.Par.0001.File.tmp/sg_ls_cs_rbibo ok_bradyk.pdf)

Συγκεντρωτικές πληροφορίες	B1R
Τύποι εκλεκτικών ανταγωνιστών	[Leu ⁸]-BK(1-8), Lys-[Leu ⁸]-BK(1-8), NPC 17731, [des-Arg ¹⁰]-HOE 140 (H158), B9958
Μηχανισμός μεταγωγής σήματος	G _{α/11} (αύξηση IP ₃ /DAG)
Ιστός έκφραση	Επάγεται μετά τον τραυματισμό των ιστών στα περισσότερα κύτταρα και ιστούς
Συσχέτιση με ασθένειες	φλεγμονή, οίδημα, πόνος, σήψη, άσθμα, νεφρική προστασία, καρδιακή προστασία, όγκος και αγγειογένεση, διαβήτης

3.4.1 Ο πολυμορφισμός -699G>C (rs4905475) του *BDKRB1* και κλινικές συσχετίσεις του

Ο πολυμορφισμός -699G>C (rs4905475, g.96721850G>C) έχει ταυτοποιηθεί στην περιοχή του υποκινητή του *BDKRB1*.²⁶⁰ Η παρουσία της κυτοσίνης αυξάνει την μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης του B1R. Η συχνότητα του αλληλομόρφου C αναφέρεται στο 12.5% σε Ευρωπαίους.²⁶¹

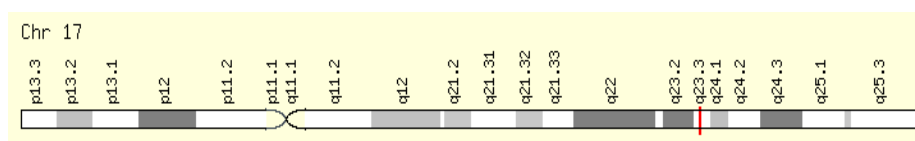
Σε ασθενείς με τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια ο rs4905475 ανιχνεύθηκε σπανιότερα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ήταν νεφροπροστατευτικός και ενισχύοντας τη σημασία της συμμετοχής των κινινών σε αυτή την παθολογική κατάσταση.²⁶⁰ Οι Kinigge et al. και Zychma et al. δε βρήκαν διαφορά της συχνότητας του -699C αλληλομόρφου μεταξύ διαβητικών και μη διαβητικών ασθενών με νεφρική νόσο.^{262, 263} Οι Bachvaron et al. μελέτησαν τον rs4905475 στην φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και βρήκαν το C αλληλόμορφο σε στατιστικά σημαντική διαφορά στο 5,7% των ασθενών και στο 33,6% των φυσιολογικών μαρτύρων.²⁶⁴

3.5 Καταβολισμός της βραδυκινίνης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο καταβολισμός του πεπτιδίου της ΒΚ πραγματοποιείται από τις εξής μεταλλοπεπτιδάσες: **i) ACE (kininase II), ii) APP, iii) NEP, iv) CPN (kininase I), v) DPPIV** (Εικόνα 25).⁵⁰ Τα παραπάνω ένζυμα βρίσκονται κατά κύριο λόγο στη κυτταρική μεμβράνη, αλλά και σε διαλυτή μορφή στο πλάσμα. Εξάιρεση αποτελεί η CPN, η οποία βρίσκεται μόνο σε διαλυτή μορφή. Αναλυτικά:

3.5.1 Μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης (ACE)

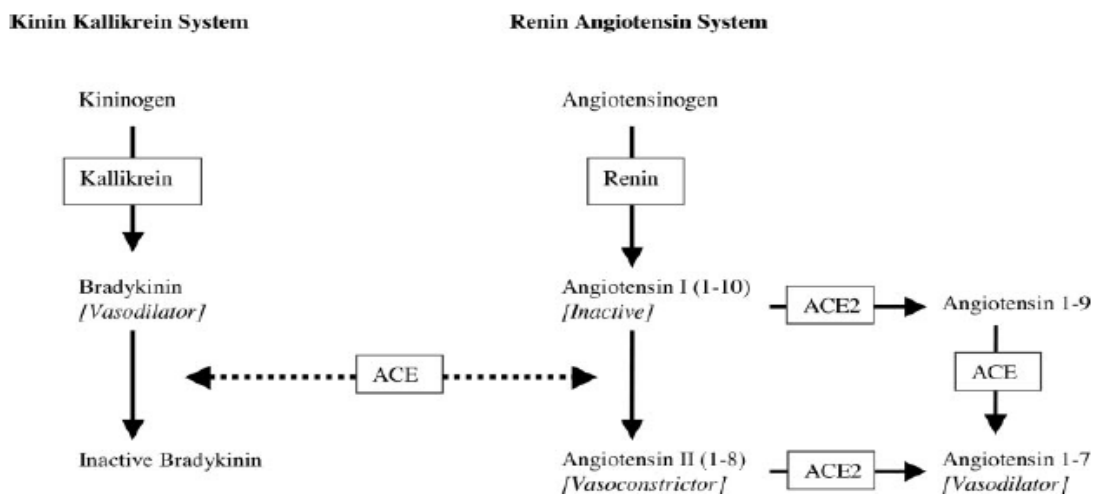
Το ACE είναι μια καλά χαρακτηριζόμενη μεταλλοπεπτιδάση που ρυθμίζει τη δραστικότητα αγγειοδραστικών πεπτιδίων όπως η αγγειοτενσίνη I (Ang I) και η ΒΚ, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης.⁵⁰ Στον *Homo sapiens* το γονίδιο του ACE εδράζεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17q23) (Εικόνα 23). Το ACE γονίδιο έχει μήκος 21kb και αποτελείται από 26 εξόνια και 25 ιντρόνια. Η δομή του ACE μπορεί να προέρχεται από πανομοιότυπο αναδιπλασιασμό ενός προγονικού γονιδίου και θεωρείται εξελικτικά ότι ο αναδιπλασιασμός του ACE έγινε πριν 300 εκατομμύρια χρόνια.²⁶⁵ Τα εξόνια, 4 έως 11 και 17 έως 24, κωδικοποιούν τις δύο ομόλογες περιοχές του μορίου του ACE, οι οποίες είναι παρόμοιες σε μέγεθος και αλληλουχίες.²⁶⁶



Εικόνα 23. Η θέση του γονιδίου του ACE στο χρωμόσωμα 17 (από <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACE>)

Το γονίδιο κωδικοποιεί δυο ισotypes του ACE: α) τον σωματικό τύπο (somatic, sACE ή ACE) με μοριακή μάζα 170 kDa και περίπου 1300 αμινοξέα, ο οποίος εκφράζεται σε ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα όπως στην αγγειακή επιφάνεια του ενδοθηλίου

των πνευμόνων και στην ψυκτροειδή μεμβράνη του εντέρου, των νεφρών και του πλακούντα και β) τον σπερματικό τύπο (germinal, gACE) με μικρότερη μοριακή μάζα, ο οποίος αποτελείται από 730 αμινοξέα μόνο, εκφράζεται αποκλειστικά στα σπερματικά κύτταρα των όρχεων και φαίνεται να παίζει ρόλο στην αναπαραγωγή.²⁶⁷ Και οι δυο τύποι μεταγράφονται από το αυτό γονίδιο με τη χρήση δύο διαφορετικών εναλλασσόμενων εκκινητών.²⁶⁶ 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, το ανάλογο με το C καρβοξυλικό άκρο της sACE.²⁶⁸ Η sACE, αν και είναι κυρίως συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη, κυκλοφορεί και ως διαλυτή μορφή στο πλάσμα.²⁶⁹ Έχει επίσης ανιχνευθεί και πρωτεΐνη συγγενική με το ACE, το ACE2 που συμμετέχει στον μεταβολισμό της Ang I και Ang II (Εικόνα 24).^{270, 271}

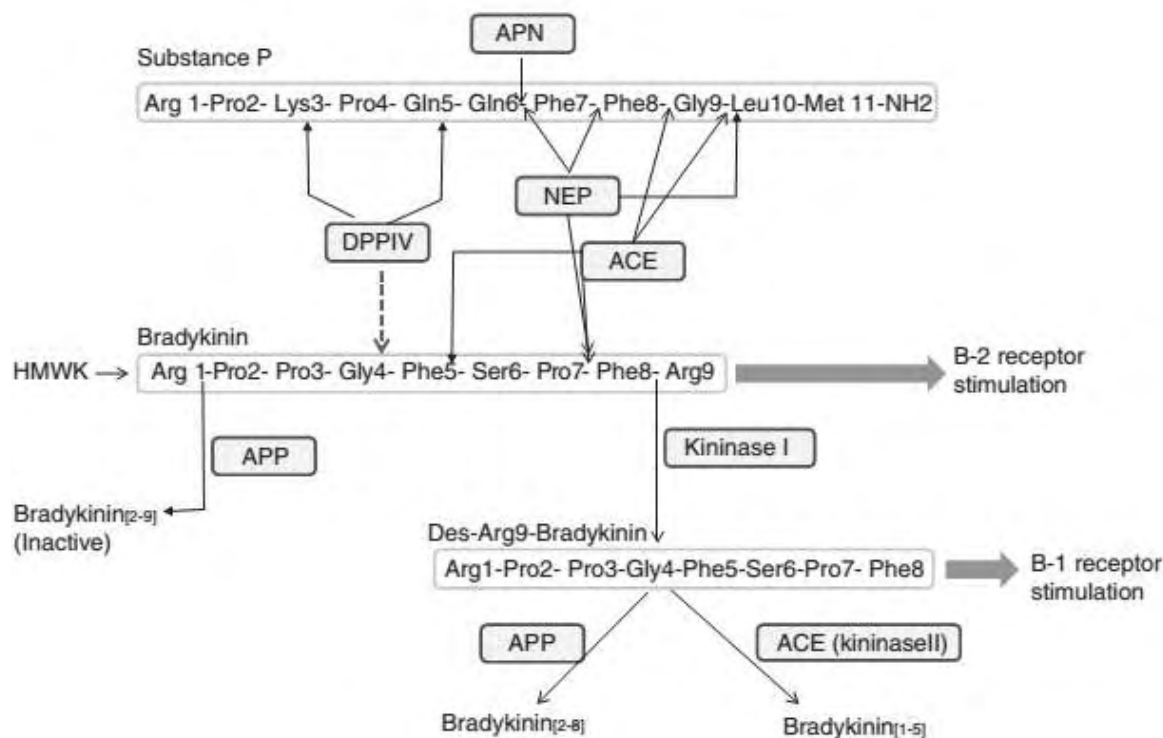


Εικόνα 24. Το ACE και το σύστημα της Κινίνης- Καλλικρεΐνης και Ρενίνης- Αγγειοτενσίνης από Sayed-Tabatabaei et al.²⁷²(RAS, Renin-angiotensin system, KKS, Kallikrein-kininogen system)

Το ACE μετατρέπει: α) το ανενεργό δεκαπεπτίδιο Ang I στο ενεργό και ισχυρό αγγειοσυσταλτικό οκταπεπτίδιο αγγειοτενσίνη II (Angiotensin II, Ang II), με την απομάκρυνση του καρβοξυτελικού διπεπτιδίου His⁹-Leu¹⁰ στο σύστημα ρενίνης - αγγειοτενσίνης (RAS, Renin-angiotensin system) και β) συμμετέχει στον καταβολισμό της BK στην ανενεργή τελική μορφή της BK_[1-5] στο KKS με την διαδοχική απομάκρυνση πρώτα του καρβοξυτελικού διπεπτιδίου Phe⁸-Arg⁹ και στη συνέχεια του διπεπτιδίου Ser⁶-Pro⁷ της BK (Εικόνα 24 και 25).²⁷² Συγκεκριμένα:

Η Ang II είναι το βασικό ενεργό προϊόν του συστήματος RAS.²⁷³ Το σύστημα RAS ρυθμίζει μακροπρόθεσμα την αρτηριακή πίεση και τον ενδοαγγειακό όγκο του αίματος. Η Εικόνα 24 δείχνει την σχέση των πρωτεϊνών στο RAS. Κατά σειρά η ρενίνη απελευθερώνεται από τα κύτταρα του σπειράματος στα νεφρά κάτω από συνθήκες άλατος, μείωσης όγκου υγρών και ενεργοποίησης του συμπαθητικού συστήματος. Η ρενίνη υδρολύει το ανενεργό πρόδρομο ζυμογόνο, αγγειοτενσινογόνο (angiotensinogen) στην Ang I και αυτή με τη σειρά της μετατρέπεται σε Ang II μέσω της δράσης του ACE. Η Ang II είναι μία ισχυρή αγγειοσυσταλτική ουσία, η οποία επίσης δρα στον φλοιό του νεφρού απελευθερώνοντας αλδοστερόνη. Η αλδοστερόνη διεγείρει τα σωληνοειδή των νεφρών με σκοπό να επαναπροσλαμβάνουν περισσότερο νάτριο και νερό από τα ούρα.²⁷⁴ Αυτό οδηγεί στην αύξηση και αποκατάσταση του ενδοαγγειακού όγκου και της πίεσης του αίματος. Επίσης η Ang II μεσολαβεί στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση διεγείροντας μια σειρά κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων.²⁷⁵ Επιπρόσθετα επηρεάζει την λειτουργικότητα του ενδοθηλίου μειώνοντας την βιοδιαθεσιμότητα του νιτρικού οξέος.²⁷⁶ Αυτά τα ευρήματα αιτιολογούν την σημαντικότητα της Ang II στην παθοφυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος. Όπως προαναφέραμε, το ACE παίζει σημαντικό ρόλο και στον καταβολισμό της BK στο σύστημα KKS (Εικόνα 24) και μέσω αυτού του μονοπατιού έχει κυρίαρχο ρόλο στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης.

Εκτός των παραπάνω, φαίνεται ότι το ACE καταβολίζει το πεπτίδιο αμυλοειδές β,²⁷⁷ ένα από του πρωταρχικούς βιολογικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου Alzheimer.^{278, 279} Το εύρημα αυτό οδήγησε σε σειρά μελετών για την επίδραση του ACE και σε άλλα νευρολογικά νοσήματα, όπως η νόσος του Parkinson και η κατάθλιψη.²⁸⁰⁻²⁸³



Εικόνα 25. Η δράση του ACE στον καταβολισμό της της BK προς σχηματισμό του μεταβολίτη της, BK_[1-5]. Φαίνεται και η δράση και των υπολοίπων ενζύμων APP, CPN, NEP και DPPIV από Inomata et al.²⁸⁴

3.5.2 Ο πολυμορφισμός I/D του ACE (*rs1799752*)

Στο NCBI (National Center for Biotechnology Information) έχουν καταγραφεί πάνω από 160 πολυμορφισμοί του ACE, οι περισσότεροι από τους οποίους είναι μονονουκλεοτιδικοί (single nucleotide polymorphisms, SNPs) και μόνο 34 εδράζονται σε κωδικοποιούμενες περιοχές.²⁷² Στο πλάσμα τα επίπεδα του ACE είναι σταθερά, όταν μετρούνται επαναλαμβανόμενα στο ίδιο άτομο, ενώ διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών ατόμων.²⁸⁵ Αυτά υποδεικνύουν ότι υπάρχει αυστηρός μακροπρόθεσμος έλεγχος του ACE στο αίμα, πιθανώς με γενετική προέλευση. Το 1990 οι Rigat et al. δημοσίευσαν μία σημαντική μελέτη, η οποία ώθησε την έρευνα στους πολυμορφισμούς του γονιδίου αυτού.²⁸⁶ 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 του ACE στα άτομα με

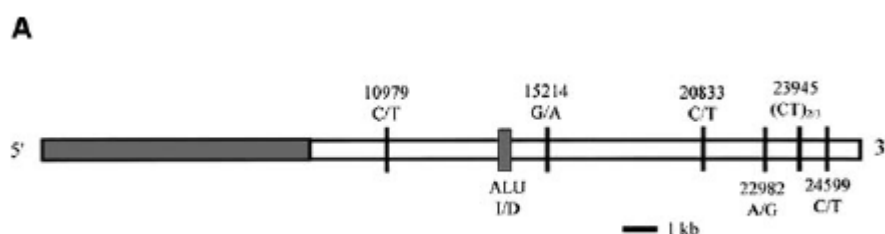
γονότυπο DD ήταν περίπου διπλάσια των επιπέδων των ατόμων με γονότυπο II. Τα άτομα με γονότυπο ID παρουσίαζαν ενδιάμεσα επίπεδα λόγω συνεπικράτησης. Στον πολυμορφισμό αυτό μπορούσε να αποδοθεί το 47% της μεταβλητότητας της τιμής του ACE στον ορό στη συγκεκριμένη μελέτη.²⁸⁶ Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η συμμετοχή του rs1799752 δεν περιορίζεται στα επίπεδα του ACE μόνο στο πλάσμα αλλά και των ιστών.^{287, 288} Αργότερα διαπιστώθηκε ότι το D αλληλίο σχετίζεται και με μεγαλύτερη ενεργότητα του ACE συγκρινόμενο με το I αλληλίο π.χ. η BK καταβολίζεται περισσότερο (D αλληλίο) ή λιγότερο (I αλληλίο), αντίστοιχα.²⁸⁹⁻²⁹¹ Η συχνότητα του I αλληλίου αναφέρεται στη βιβλιογραφία στο 40%.²⁹²

Ο rs1799752 του ACE αρχικά ανιχνεύτηκε με την τεχνική ανάλυσης πολυμορφισμών με χρήση περιοριστικών ενζύμων (RFLP, restriction fragment length polymorphism). Στην πρώτη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) για την ανίχνευση του rs1799752 ο Rigat χρησιμοποίησε ζεύγος εκκινητών που συνόρευαν με την αλληλουχία εισαγωγής.²⁹³ Όμως μελέτη από τους Shanmugan et al. βασισμένη σε οικογένειες έδειξε ότι με αυτή την PCR μέθοδο υπάρχει πιθανότητα εσφαλμένης ταξινόμησης 4-5% ID ετερόζυγων στην ομάδα των DD ομόζυγων.²⁹⁴ Μία επιπρόσθετη PCR σχεδιάστηκε με νέο ζεύγος εκκινητών, πιο ειδικό της εισαγωγής I, για τον ακριβέστερο προσδιορισμό και επαλήθευση των DD γονοτύπων.²⁹⁴ Αυτός ο συνδυασμός των δύο PCR χρησιμοποιήθηκε σε πολλές μελέτες στη συνέχεια.

Το γεγονός ότι ο rs1799752 του ACE εδράζεται σε μη κωδικοποιούμενη περιοχή κάνει απίθανο το γεγονός να αποτελεί και τον υπεύθυνο λειτουργικό πολυμορφισμό. Επειδή η σημασία του rs1799752 ανακαλύφθηκε μελετώντας τα επίπεδα του ACE στο πλάσμα, πολλοί ερευνητές ακολούθησαν την ίδια πορεία με σκοπό την ανίχνευση λειτουργικών πολυμορφισμών. Το 1996 οι Villard et al. πρότειναν δύο θέσεις ποσοτικών γνωρισμάτων (QTLs, quantitative trait loci) που ελέγχουν τα επίπεδα του ACE. Ισχυρίστηκαν ότι η μία QTL ήταν σε κοντινή ανισορροπία σύνδεσης (LD, linkage disequilibrium) με τον I/D πολυμορφισμό, ενώ η άλλη πιθανή θέση αναγνωρίστηκε στην 5' περιοχή του γονιδίου.²⁹⁵

Οι Keavney et al. μελέτησαν τα επίπεδα του ACE στο πλάσμα και 10 πολυμορφισμούς (συμπεριλαμβανομένου και του I/D) σε όλη την έκταση του ACE σε

Καυκάσιους Βρετανούς και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο υπεύθυνος λειτουργικός πολυμορφισμός πιθανώς εντοπίζεται κάτωθεν του πολυμορφισμού rs4305 στο ιντρόνιο 5 και προς την 3' περιοχή.^{296, 297} Ακολουθώντας το εύρημα των Keavney et al. , οι Zhu et al. εστίασαν και χαρτογράφησαν 7 πολυμορφισμούς κατά μήκος μιας περιοχής 16kB στην 3' περιοχή του ACE (Εικόνα 26) σε 159 Αφροκαριμπιανούς από την Τζαμάικα. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι ο λειτουργικός πολυμορφισμός βρίσκεται στην περιοχή μεταξύ του πολυμορφισμού 15214G/A (rs4344) στο ιντρόνιο 18 και του 23945(C/T)_{2/3} στην 3' UTR, αποκλείοντας έτσι την περιοχή με τον γνωστό πολυμορφισμό I/D στο ιντρόνιο 16 (Εικόνα 26).²⁹⁸



Εικόνα 26. Σχηματική ανάλυση του γονιδίου του ACE στην περιοχή που εδράζονται οι 7 πολυμορφισμοί που μελέτησε ο Zhu et al.²⁹⁸

Στη συνέχεια, οι Soubrier et al. επιβεβαίωσαν την προηγούμενη μελέτη των Zhu et al. σχετικά με την περιοχή κοντά στον πολυμορφισμό 23945(C/T)_{2/3} μέσω αλληλούχισης του ACE.²⁹⁹ Επιπρόσθετα οι Cox et al. ανίχνευσαν 4 πολυμορφισμούς που σχετιζόταν με τα επίπεδα του ACE στο πλάσμα, οι 3 από αυτούς ήταν κοντά στην προηγούμενη αναφερθείσα 3' περιοχή και ο τέταρτος πολυμορφισμός (A6138C) ήταν στην 5' περιοχή.³⁰⁰ Την πιθανή παρουσία ενός λειτουργικού πολυμορφισμού στην 5' περιοχή ενίσχυσε και μελέτη από τους McKenzie et al.³⁰¹ Οι δύο τελευταίες μελέτες έρχονταν σε συμφωνία με την αρχική μελέτη των Villard et al.²⁹⁵ οι οποίοι, όπως αναφέρθηκε, θεώρησαν ότι πιθανώς υπάρχουν δύο QTLs συνδεδεμένα με το ACE , στην 3' και 5' περιοχή, και τα οποία ελέγχουν την ενεργότητα της πρωτεΐνης.²⁹⁵ Αποδεικνύοντας την πολυπλοκότητα της ρύθμισης του ACE οι Kammerer et al., μελετώντας 29 οικογένειες, εμφάνισαν ισχυρά στοιχεία ότι τα επίπεδα του ACE συσχετίζονται και με άλλο QTL στο

χρωμόσωμα 4, εκτός του χρωμοσώματος 17 και ανεξάρτητα από αυτό.³⁰² Η φύση της θέσης αυτής παραμένει άγνωστη και δε γνωρίζουμε αν αποτελεί ένα ρυθμιστικό γονίδιο του ACE. Το τελικό συμπέρασμα από τα παραπάνω είναι ότι μέχρι στιγμής η φύση και η θέση του ή των λειτουργικών πολυμορφισμών που ρυθμίζουν τα επίπεδα του ACE στο πλάσμα παραμένει μυστήριο.

3.5.2 Κλινικές συσχετίσεις του I/D πολυμορφισμού (rs1799752) του ACE

Μέχρι σήμερα πάνω από 1700 μελέτες έχουν δημοσιευτεί που ερευνούν την σχέση του I/D πολυμορφισμού με ένα μεγάλο αριθμό νοσημάτων. Οι μελέτες αυτές συμπεριέλαβαν όχι μόνο τον κίνδυνο εμφάνισης ή όχι της νόσου, αλλά και άλλα στοιχεία όπως συμπτώματα της νόσου, αποτελεσματικότητα θεραπειών, αλληλεπίδραση με γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, εξέλιξη και προσδόκιμο επιβίωσης της εκάστοτε νόσου. Παρακάτω παρατίθενται με όσο πιο δυνατό περιεκτικό τρόπο τα κυριότερα νοσήματα και καταστάσεις που μελετήθηκαν σε σχέση με τον rs1799752, ενώ η σχέση του με το ΚΑΟ αναφέρεται στην παράγραφο 4.

Καρδιαγγειακές διαταραχές

Πολλές μελέτες ανέλυσαν αν η ύπαρξη του D αλληλίου σχετίζεται με την υπέρταση. Οι πρώτες προσπάθειες έδειξαν έλλειψη συσχέτισης,^{140, 303-308} ενώ αργότερα ορισμένες μελέτες ισχυρίστηκαν το αντίθετο.³⁰⁹⁻³¹¹ Έτσι χρησιμοποιήθηκαν εκτενείς μετα-αναλύσεις στο ζήτημα αυτό. Η πρώτη μετα-ανάλυση από 23 μελέτες υποστήριξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του D αλληλίου και της υπέρτασης στο σύνολο, παρά μόνο σε υποομάδες όπως οι γυναίκες και οι Ασιάτες.³¹² Επόμενη μετα-ανάλυση αποκλειστικά σε Καυκάσιους, η οποία συμπεριέλαβε μελέτες με μικρή επικάλυψη με την προηγούμενη μετα-ανάλυση, υποστήριξε και πάλι ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της υπέρτασης με το D αλληλίο.³¹³ Η τελευταία μετα-ανάλυση το 2005 συμπεριέλαβε μία λίστα 26 καινούριων μελετών, από τις οποίες 12 είχαν θετική συσχέτιση και 14 αρνητική.³¹⁴ Ο κύριος όγκος των στοιχείων δείχνουν ότι **αν υπάρχει επίδραση της παρουσίας του D αλληλίου στην υπέρταση αυτή είναι ελάχιστη**, ενώ

πιθανώς εξαρτάται από την επίδραση άλλων γονιδίων ή/και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Πολυάριθμες μελέτες εξέτασαν τη σχέση του I/D πολυμορφισμού με τη αθηροσκλήρωση χρησιμοποιώντας μετρήσεις του πάχους του έσω χιτώνα της καρωτίδας (intima media thickness). Μεγάλη μετα-ανάλυση το 2002 από 23 μελέτες υποστήριξε ότι **υπάρχει μέτρια θετική συσχέτιση του D αλληλίου με την αθηροσκλήρωση**, αλλά η συσχέτιση αυτή γίνεται ακόμα πιο ισχυρή στα άτομα που έχουν και άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου.³¹⁵

Επίσης πολυάριθμες μελέτες ανίχνευσαν τη σχέση του I/D πολυμορφισμού με το έμφραγμα μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI) και η πρώτη θετική συσχέτιση του D αλληλίου έγινε το 1992.³¹⁶ Στην πρώτη όμως μεγάλη μελέτη το 1997 δε βρέθηκε καμία συσχέτιση.³¹³ Το 2000 η ίδια ομάδα των Agerholm-Larsen et al. σε μετα-ανάλυση 22 μελετών βρήκαν συσχέτιση, αλλά κατέληξαν ότι οι μικρές μελέτες (<600 άτομα) ευθυνόταν για το θετικό αποτέλεσμα, ενώ στις μεγάλες μελέτες δεν υπήρξε ανάλογη συσχέτιση.³¹³ Παρομοίως σε επόμενη μετα-ανάλυση των Keavney et al. σε ασθενείς με MI και στεφανιαία νόσο τα θετικά αποτελέσματα ήταν εμφανή στις 48 μικρότερες μελέτες (<200 περιπτώσεις), ενώ αντίθετα στις 29 μεγαλύτερες δεν υπήρξε τέτοια συσχέτιση.³¹⁷ Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι μπορεί οι μικρές μελέτες να είναι πιο επιρρεπείς σε στατιστικά λάθη, αλλά από την άλλη αυτού του μεγέθους οι μελέτες αναφέρονται συνήθως σε επιλεγμένους πληθυσμούς, όπως υψηλού κινδύνου άτομα η νοσηλευόμενους. **Ίσως τελικά το αλληλίο D να παίζει σημαντικό ρόλο σε τέτοιες ομάδες ασθενών με στεφανιαία νόσο, αλλά όχι στο γενικό πληθυσμό.** Μία ακόμα μετα-ανάλυση το 2007, επιβεβαίωσε την έλλειψη συσχέτισης του D αλληλίου με τον κίνδυνο εμφάνισης της ισχαιμικής νόσου.³¹⁸

Όσον αφορά το ισχαιμικό ΑΕΕ (αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο) δύο μετα-αναλύσεις ανέφεραν αρχικά σημαντική θετική συσχέτιση με το D αλληλίο,^{319, 320} εύρημα το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε σε επόμενη προοπτική μελέτη.³²¹ Το συμπέρασμα είναι ότι **οποιοδήποτε επίδραση του ACE I/D στο ισχαιμικό ΑΕΕ, αν υπάρχει, είναι μικρή.**²⁷²

Νοσήματα νεφρών

Εξαιτίας του κεντρικού ρόλου του ACE στο σύστημα RAS μεγάλος αριθμός μελετών ερεύνησαν την σχέση του rs1799752 με νεφρικές παθήσεις, όπως η διαβητική νεφροπάθεια. Δύο μετα-αναλύσεις, η πιο πρόσφατη το 2007 σε 17727 άτομα, ανίχνευσαν σημαντική αύξηση του κινδύνου διαβητικής νεφροπάθειας σε φορείς του D αλληλίου.^{312, 322} Το ίδιο εύρημα επιβεβαιώθηκε και σε επόμενη προοπτική μελέτη κοορτής (cohort study).³²³ Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι υπάρχουν ισχυρά στοιχεία **αιτιολογικής σχέσης μεταξύ της διαβητικής νεφροπάθειας και της λειτουργίας του ACE.**²⁷²

Σε σχέση όμως **με άλλα νοσήματα των νεφρών τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ξεκάθαρα.** Μετα-αναλύσεις προσπάθησαν να ερευνήσουν εάν η ύπαρξη του D αλληλίου σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης της πολυκυστικής νόσου των νεφρών (Autosomal dominant polycystic kidney disease),³²⁴ της εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης (Focal Segmental Glomerulosclerosis),³²⁵ της IgA Νεφροπάθειας,³²⁶ της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας επί εδάφους νεφροπάθειας³²⁷ και του ιδιοπαθούς νεφρωσικού συνδρόμου της παιδικής ηλικίας.³²⁸ Θετική συσχέτιση του D αλληλίου διαπιστώθηκε με την εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση στην ομάδα των Ασιατών και όχι στους Καυκάσιους ή Αφρικανούς, καθώς και με το ιδιοπαθές νεφρωσικό σύνδρομο σε παιδιά στην Ασία. Όσον αφορά την θεραπεία των νεφρικών νοσημάτων σε Καυκάσιους με DD γονότυπο φάνηκε καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με ACEi συγκριτικά με τους ασθενείς με γονότυπο II, όσον αφορά την αρτηριακή πίεση, την πρωτεϊνουρία, τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης και την εξέλιξη σε τελικού σταδίου νεφροπάθεια.^{329, 330}

Άλλες συσχετίσεις

Επειδή το ACE μπορεί να καταβολίζει και το πεπτίδιο αμυλοειδές β *in vitro*,²⁷⁷ υπήρξε η υπόθεση ότι ο γονότυπος DD και τα υψηλότερα επίπεδα ACE πιθανώς να παίζουν προστατευτικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου Alzheimer (AD). Οι Kehoe et al. υποστήριξαν για πρώτη φορά ότι υπάρχει **θετική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του I αλληλίου και της AD**³³¹ και μία μεταγενέστερη μετα-ανάλυση σε 2861 άτομα επιβεβαίωσε ότι η συσχέτιση παραμένει ισχυρή.³³² Τέλος σε αθλητές **βρέθηκε συσχέτιση**

του Ι αλληλίου με την βελτιωμένη μυϊκή αντοχή³³³⁻³³⁹ και υπάρχουν ενδείξεις, χωρίς να έχουν επιβεβαιωθεί, συσχέτισης του ACE και της μακροζωίας.³⁴⁰

3.5.2 Υπόλοιπα ένζυμα του καταβολισμού της βραδυκινίνης

Aminopeptidase P, APP (EC 3.4.11.9)

Η ανθρώπινη APP υπάρχει σε δύο μορφές, οι οποίες έχουν ομολογία 43% : α) μια συνδεδεμένη με την κυτταρική μεμβράνη (membrane-bound APP, mAPP) με γλυκοφωφατιδυλοινωσιτόλη (GPI) και β) και μια κυτταροπλασματική μορφή (cytosolic APP, cAPP). Η mAPP εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων στην επιφάνεια που βλέπει προς τον αυλό, στην ψυκτροειδή παρυφή του εντερικού επιθήλιου και του νεφρικού επιθήλιου του εγγύς εσπειραμένου.^{341, 342} Η mAPP καταβολίζει τόσο την BK, όσο και την des-Arg- BK στις αδρανείς BK_[2-9] και BK_[2-8] απομακρύνοντας την αμινοτελική αργινίνη (Arg¹). **Η mAPP αποτελεί την κύρια οδό απενεργοποίησης της des-Arg-BK** (Εικόνα 25).^{151, 343}

Κινινάση Ι, CPN (καρβοξυπεπτιδάση Ν, EC 3.4.17.3)

Η CPN παράγεται στο ήπαρ σε τετραμερή μορφή και εκκρίνεται στο πλάσμα, όπου διασπά μια μεγάλη ποικιλία δραστικών πεπτιδίων αφαιρώντας την καρβοξυτελική Arg ή Lys (Εικόνα 25). Διασπά ποικιλία δραστικών πεπτιδίων και φαίνεται ότι ο ρόλος της είναι προστατευτικός καθώς έκτος της BK, διασπά τις αναφυλατοξίνες C3a, C4a και C5a (αφαιρώντας την καρβοξυτελική Arg).⁵⁰ Η κινινάση Ι διασπά τη BK σε des-Arg- BK, η οποία είναι ο κύριος αγωνιστής των B1R. **Υπό φυσιολογικές συνθήκες αποτελεί ένα έλασσον δρόμο καταβολισμού της BK.** Υπό αναστολή όμως του ACE, ο ρόλος της γίνεται σημαντικότερος και τετραπλασιάζεται η συμμετοχή της στη διάσπαση της BK.³⁴⁴

Nepilysin, NEP (neutral endopeptidase) (EC 3.4.24.11)

Η NEP είναι μια μεμβρανική μεταλλοπεπτιδάση κατά κύριο λόγο και ανιχνεύεται σε πολλούς ιστούς όπως στα νεφρά, στο ενδοθήλιο, στο ΚΝΣ, στους πνεύμονες.^{146, 148, 345,}³⁴⁶ Καταβολίζει μια σειρά πεπτιδίων όπως BK, SP (Substance P), atrial natriuretic peptide (ANP), endothelin-1 και amyloid- β-peptide.^{347, 348} Καταβολίζει την αμινική πλευρά

υδρόφοβων υπολειμμάτων αμινοξέων και συγκεκριμένα από τη BK αφαιρεί το διπεπτίδιο Phe⁸-Arg⁹ και εν συνεχεία το τριπεπτίδιο Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷ παράγοντας τον ανενεργό μεταβολίτη BK_[1-4] (Εικόνα 25).³⁴⁹ Είναι πιθανό ότι διασπά και την des-Arg- BK στον ίδιο ανενεργό μεταβολίτη BK_[1-4]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες στον άνθρωπο αποτελεί ένα έλασσον δρόμο καταβολισμού της BK στο πλάσμα, αλλά **είναι το κύριο ένζυμο καταβολισμού των κινινών στο νεφρό και παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση της BK στο ενδοθήλιο.**⁵⁰

Υπό αναστολή του ACE σε πειραματόζωα ο ρόλος της NEP αυξάνεται στον καταβολισμό της BK³⁵⁰ και υπό αναστολή της NEP αυξάνει ο χρόνος ημίσειας ζωής της BK σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων.³⁵¹ Σε κλινική μελέτη χορήγησης ομαπατριλάτης (omapatrilat – διπλός αναστολέας του ACE και της NEP) εμφανίσθηκε πολλαπλάσιος κίνδυνος ΑΟ συγκριτικά με την εναλαπρίλη (ACEi).³⁵² Τα παραπάνω υποστηρίζουν **το ρόλο της NEP στον καταβολισμό της BK σε συνθήκες αναστολής του ACE.**

Dipeptidyl peptidase IV, DPPIV (EC 3.4.14.5)

Η DPPIV παίζει ρόλο στον καταβολισμό της BK και της SP.^{353, 354} Η SP είναι νευροπεπτίδιο (εντεκαπεπτίδιο), το οποίο ανήκει στις νευροκινίνες και απελευθερώνεται από τις νευρικές αλγαισθητικές ίνες (από ευαίσθητους σε καψαϊσίνη νευρώνες). Παρουσιάζει αγγειοδιασταλτική δράση, μέσω αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας και πλειοτρόπο φλεγμονώδη δράση.^{355, 356} Η BK δρα στις νευρικές ίνες και διεγείρει την έκκριση της SP, αλλά και η SP ευοδώνει την παραγωγή κινινών με τη σειρά της.³⁵⁶ Η DPPIV καταβολίζει την SP σε SP_[3-11] και μετά σε SP_[5-11] και τον μεταβολίτη της BK_[2-9], από την δράση της APP, στο τελικό BK_[4-9] (Εικόνα 25). Η DPPIV παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή απάντηση, στη παθογένεια της HIV λοίμωξης, σε μεταστάσεις όγκων και στη ρύθμιση του σακχάρου του αίματος.³⁵⁷

Ο C1-INH και ο πολυμορφισμός V480M (rs4926) στο *SERPING1* και κλινικές συσχετίσεις του

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της παθοφυσιολογίας του ΚΑΟ, ο C1-INH αναστέλλει τον FXIIa και την KL αποτελώντας έτσι το **κύριο ρυθμιστικό ανασταλτικό παράγοντα του CS** (Εικόνα 7). Στον πολυμορφισμό rs4926 στο *SERPING1*, λόγω της μετάπτωσης μιας γουανίνης σε αδενίνη στο εξόνιο 8, η μεθειονίνη αντικαθιστά ένα κατάλοιπο της βαλίνης στο υδρόφοβο ενεργό τμήμα του μορίου του C1-INH. Μέχρι στιγμής ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δε φαίνεται να επηρεάζει τη δομή, τη σταθερότητα, την συγκέντρωση του C1-INH, ή την αναστολή του C1, χωρίς να αποκλείεται να παίζει ρόλο σε άλλες λειτουργίες του μορίου.³⁵⁸ Η συχνότητα του αλληλομόρφου M480 σε Ευρωπαίους είναι περίπου 26.6%.³⁵⁹

Ο πολυμορφισμός V480M φαίνεται να σχετίζεται με την κατάσταση φορέας από τον *Staphylococcus aureus* στο ρινικό βλεννογόνο, δηλαδή η παρουσία του αλληλίου M480 βοηθούσε στον αποικισμό του βλεννογόνου από τον σταφυλόκοκκο.³⁶⁰ Σε άλλες μελέτες δε φάνηκε να συσχετίζεται: α) με την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας σε πληθυσμό Han στην Κίνα σε δύο μελέτες,^{361 362} β) με τη βαρύτητα της ρευματοειδούς αρθρίτιδας,³⁶³ γ) με την τροποποίηση της φαρμακοκινητικής του ανοσοκατασταλτικού tacrolimus σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού.³⁶⁴

4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΤΟΥ ΚΑΟ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η βαρύτητα του ΚΑΟ μπορεί να μεταβάλλεται στον ίδιο τον ασθενή ακόμα και στη διάρκεια της ζωής του. Επίσης άτομα με ΚΑΟ, που ανήκουν στην ίδια οικογένεια και φέρουν την ίδια μετάλλαξη, παρουσιάζουν διαφορετική κλινική εικόνα σε σημαντικό βαθμό. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι άλλοι επιπρόσθετοι παράγοντες (γενετικοί και περιβαλλοντικοί) επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου. Το εύρος της συχνότητας των επεισοδίων μπορεί να κυμαίνεται από ασυμπτωματική εικόνα (σπάνιες περιπτώσεις), ως και συχνά εβδομαδιαία επεισόδια.^{63, 73, 74} Στην παράγραφο αυτή αναφέρονται οι μέχρι στιγμής μελέτες, όσον αφορά την επίδραση στην φαινοτυπική ποικιλομορφία του ΚΑΟ: α) των πολυμορφισμών *BDKRB1* (rs4905475), *F12* (rs1801020), *ACE I/D* (rs1799752), *SERPING1* (rs4926) της μελέτης και β) άλλων γενετικών παραγόντων.

4.1 Φαινότυπος του ΚΑΟ και οι πολυμορφισμοί *BDKRB1* (rs4905475), *F12* (rs1801020), *ACE I/D* (rs1799752), *SERPING1* (rs4926) της μελέτης

Ο φαινότυπος του ΚΑΟ δε φάνηκε να σχετίζεται με τον rs4905475 στο *BDKRB1* και τον rs1799752 του *ACE* σε 69 ασθενείς.³⁶⁵ Ο πολυμορφισμός rs1801020 του *F12* έχει πρόσφατα συσχετιστεί με τον φαινότυπο του ΚΑΟ και βρέθηκε ότι ασθενείς με γονότυπο CC εκδηλώνουν πρώιμα τη νόσο.⁷⁵ Όσον αφορά τον πολυμορφισμό V480M δεν έχει μελετηθεί στο ΚΑΟ ακόμη.

4.2 Φαινότυπος του ΚΑΟ και άλλοι γενετικοί παράγοντες

Ο φαινότυπος του ΚΑΟ δε φάνηκε να σχετίζεται με τον πολυμορφισμό 1098A>G (rs11620928) στο *BDKRB1*, ούτε με τον -58C>T και 181C>T στο *BDKRB2*.³⁶⁵ Πολυμορφισμοί στο *BDKRB2* και συγκεκριμένα ένας συνήθης πολυμορφισμός του *BDKRB*, η απουσία 9 (-9) ζευγών βάσεων στο εξόνιο 1 (rs5810761), αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου και τη βρογχοδιασταλτική απάντηση στη ΒΚ. Ο rs5810761 αρχικά φάνηκε

να επηρεάζει τη βαρύτητα του ΚΑΟ σε μια μικρή ομάδα ασθενών,³⁶⁶ το οποίο εύρημα όμως δεν επαληθεύθηκε σε επόμενη μελέτη με 37 ασθενείς.³⁶⁷ Η κλινική βαρύτητα του ΚΑΟ συσχετίστηκε ακόμη με τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *C4B* και συγκεκριμένα με ηπιότερη κλινική νόσο, δηλαδή οι ασθενείς με 3 ή 4 αντίγραφα *C4B* είχαν μικρότερο αριθμό επεισοδίων ΑΟ και διάγνωση του ΚΑΟ σε μεγαλύτερη ηλικία.³⁶⁸

Αρχικά η κλινική βαρύτητα του ΚΑΟ δεν είχε συσχετιστεί με το είδος της μετάλλαξης.^{77, 78} Αργότερα, σε μελέτη με ασθενείς Ασιατικής αγωγής φάνηκε ότι οι μεταλλάξεις απώλειας νοήματος (nonsense), αλλαγής της θέσης ματίσματος (frameshift) και μεταλλάξεις στη θέση Arg466 (που αιτιολογούν συχνότερα ΚΑΟ τύπου II) προκαλούν χαμηλότερα αντιγονικά επίπεδα C1INH συγκριτικά με τα άλλα είδη μεταλλάξεων, όμως η διαφορά αυτή δεν απεικονιζόταν και στον φαινότυπο της νόσου.³⁶⁹ Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι η παρουσία παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων (missense) σχετίζεται με ηπιότερη κλινική βαρύτητα του ΚΑΟ.⁷⁵ Το παραπάνω θετικό εύρημα επιβεβαιώθηκε από τους Speletas et al. σε ακόμη μεγαλύτερη πολυκεντρική μελέτη υποδεικνύοντας ότι οι μεταλλάξεις στο *SERPING1* δεν είναι ο μοναδικός καθοριστικός παράγοντας του κλινικού φαινοτύπου στο ΚΑΟ.⁷⁶

Στην Ελλάδα δεν υπάρχει μια συνολική καταγραφή των ασθενών με ΚΑΟ, εκτός από μεμονωμένες αναφορές, αλλά και ούτε έχουν περιγραφεί τα συγκεκριμένα προβλήματα των ασθενών αυτών, έτσι ώστε να εκτιμηθούν τα επιδημιολογικά, κλινικά και θεραπευτικά χαρακτηριστικά της νόσου. Η απουσία τέτοιων στοιχείων καθιστά αδύνατη την εκτίμηση των προβλημάτων της σπάνιας αυτής πάθησης, όπως και την αντιμετώπισή τους υπό το πρίσμα μιας πανελλαδικής προσπάθειας με προφανείς συνέπειες για τους ίδιους τους ασθενείς.

Όπως αναφέρθηκε, το ΚΑΟ τύπου I και II οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *SERPING1*. Ασθενείς της ίδιας οικογένειας έχουν διαφορετικό φαινότυπο της νόσου, ενώ φέρουν την ίδια μετάλλαξη. Αλλά και στο ίδιο άτομο η νόσος μπορεί να έχει διαφορετική βαρύτητα σε διαφορετικές περιόδους της ζωής του. Έτσι η κλινική εκδήλωση του ΚΑΟ και συγκεκριμένα η συχνότητα, η εντόπιση και η βαρύτητα των κρίσεων καθορίζεται από άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες ή/και από την αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Οι μελέτες συσχέτισης των πολυμορφισμών γονιδίων με νοσήματα είναι ένα χρήσιμο επιδημιολογικό εργαλείο για την κατανόηση των νοσημάτων αυτών. Είδαμε ότι ο FXII έχει κεντρική θέση στην έναρξη τους συστήματος επαφής, το οποίο και είναι ενεργοποιημένο στις κρίσεις του ΚΑΟ. Ακόμη μεταλλάξεις αυξημένης λειτουργικότητας (gain of function mutation) στο *F12* ευθύνονται για το ΚΑΟ με φυσιολογικό C1-INH. Το ένζυμο ACE παίζει σημαντικό και κεντρικό ρόλο στην αποδόμηση της BK και στον τερματισμό της ενεργοποίησης του CS. Επίσης οι ACEi, τα φάρμακα που αναστέλλουν το ACE, μπορεί να προκαλέσουν ΑΟ σε ορισμένα άτομα, όπως και σε ασθενείς με ΚΑΟ να επιδεινώσουν τις κρίσεις. Ο B1R εκφράζεται σε καταστάσεις ιστικής βλάβης και φλεγμονής, τα οποία είναι γνωστά εκλυτικά αίτια του ΚΑΟ, και ο υποδοχέας αυτός ενεργοποιείται κυρίως από την des-Arg-BK, τον μεταβολίτη της BK. Ο C1-INH παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια του ΚΑΟ με την πολλαπλή ανασταλτική λειτουργία του. Αυτά τα στοιχεία οδήγησαν την υπόθεση ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια, τα οποία παράγουν τις παραπάνω πρωτεΐνες, μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη σοβαρότητα ή τη συχνότητα των κρίσεων του ΚΑΟ.

Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν οι πολυμορφισμοί *BDKRB1 -699G>C (rs4905475)*, *F12 5046T>C (rs1801020)*, *ACE-I/D (rs1799752)* και *SERPING1 21963G>A (rs4926)*. Η επιλογή των ως άνω πολυμορφισμών έγινε διότι φαίνεται ότι είναι λειτουργικοί και επηρεάζουν την παθογένεια και τον φαινότυπο διάφορων ασθενειών, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια. Τα ως τώρα γνωστά δεδομένα για την επίδραση των πολυμορφισμών αυτών στον φαινότυπο του ΚΑΟ αναφέρονται αναλυτικά στην ενότητα της παρούσας διατριβής «Γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον φαινότυπο του ΚΑΟ». Η εύρεση συσχετίσεων ή ακόμα και η κατανόηση της επίδρασης των πολυμορφισμών αυτών μπορεί να βοηθήσει, ώστε να εκτιμηθεί καλύτερα η πορεία και η πρόγνωση του ΚΑΟ και να προταθούν ίσως καινούργιοι θεραπευτικοί στόχοι.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διατριβή είχε συγκεκριμένα τους παρακάτω στόχους:

- την πολυκεντρική καταγραφή του μεγαλύτερου δυνατού αριθμού Ελλήνων ασθενών με ΚΑΟ και την ανεύρεση αδιάγνωστων ασθενών,
- την καταγραφή των δημογραφικών, κλινικών και θεραπευτικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ΚΑΟ στην Ελλάδα,
- την καταγραφή των εργαστηριακών ευρημάτων και την ταξινόμηση της νόσου σε ΚΑΟ τύπου I και II,
- τη σύγκριση των παραπάνω με τα αντίστοιχα ευρήματα από τη διεθνή βιβλιογραφία,
- τη δημιουργία ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων των Ελλήνων ασθενών,
- την καταγραφή των προβλημάτων που προέρχονται από το ΚΑΟ σε διάφορες πτυχές της ζωής των ασθενών,
- την καταγραφή των γενεαλογικών δέντρων των οικογενειών με ΚΑΟ,
- την μοριακή ανίχνευση των πολυμορφισμών *rs4905475*, *rs181020*, *rs1799752* και *rs4926* στο πληθυσμό των Ελλήνων ασθενών με ΚΑΟ και τη συσχέτιση των παραπάνω πολυμορφισμών με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την ευρύτερη δυνατή καταγραφή γνωστών ασθενών με ΚΑΟ, αλλά και την αναζήτηση νέων ασθενών σε όλη την Ελλάδα. Λόγω της σπανιότητας του νοσήματος ήταν απαραίτητη η πολυκεντρική καταγραφή του νοσήματος μέσω της συνεργασίας με νοσοκομεία, πανεπιστημιακά τμήματα και ιατρεία που παρακολουθούσαν ασθενείς σε όλη τη χώρα υπό την αιγίδα της Ελληνικής Εταιρείας Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας (Ε.Ε.Α.Κ.Α.). Τα κέντρα που συμμετείχαν στην καταγραφή των ασθενών με ΚΑΟ αναφέρονται στον Πίνακα 6 κατά αλφαβητική σειρά.

Πίνακας 6. Πολυκεντρική καταγραφή ασθενών με ΚΑΟ και συμμετέχοντα τμήματα νοσοκομείων και πανεπιστημίων κατά αλφαβητική σειρά

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ - ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ	ΤΜΗΜΑ
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης	Α΄ και Δ΄ Πανεπιστημιακή Παιδιατρική κλινική
Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό»	Αλλεργιολογικό τμήμα
Γενικό Νοσοκομείο Μυτιλήνης «Βοστάνειο»	Ωτορινολαρυγγολογική κλινική
Γενικό Νοσοκομείο Παιδών «Π. & Α. Κυριακού»	Παιδοαλλεργιολογική Πανεπιστημιακή μονάδα
Ιατρική Σχολή Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	Εργαστήριο Ανοσολογίας
Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών και τα υπόλοιπα νοσοκομεία των ενόπλων δυνάμεων	Αλλεργιολογικό τμήμα

Στους ασθενείς των τμημάτων αυτών ζητήθηκε να συμμετέχουν στην παρούσα μελέτη μετά από τηλεφωνική επικοινωνία μαζί τους και μετά από συνεννόηση με τους θεράποντες ιατρούς τους. Σε θετική απάντηση προσερχόταν ο ασθενής και γινόταν καταγραφή των χαρακτηριστικών της νόσου με τυποποιημένο αναλυτικό ερωτηματολόγιο και λήψη περιφερικού αίματος για τον γενετικό έλεγχο μετά από συγκατάθεσή του. Σε περιπτώσεις ασθενών που ήθελαν να συμμετέχουν αλλά αδυνατούσαν να προσέλθουν ή ζούσαν σε απομακρυσμένες περιοχές, ο υποψήφιος διδάκτορας πραγματοποιούσε την παραπάνω διαδικασία με κατ' οίκον επίσκεψη.

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων, στην μελέτη των πολυμορφισμών των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 108 φυσιολογικούς δότες περιφερικού αίματος από τη βάση δειγμάτων του εργαστηρίου Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας. Οι δότες ήταν 53 άνδρες και 55 γυναίκες με μέση ηλικία τα 62.3 έτη και ηλικιακό εύρος από 10 έως 90 έτη. Η ομάδα αυτή χρησίμευσε ως η υγιής ομάδα μαρτύρων, ώστε να εκτιμηθεί ο επιπολασμός του καθενός εξεταζόμενου πολυμορφισμού στο γενικό Ελληνικό πληθυσμό. Όλα τα δείγματα προήλθαν από Ελληνικής καταγωγής ανεξάρτητα άτομα (μη συγγενείς).

Η έρευνα διεξήχθη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι, η οποία συντάχθηκε από την Παγκόσμια Ιατρική Ένωση. Γραπτή συγκατάθεση δόθηκε από το κάθε άτομο ή τον συνοδεύοντα συγγενή, στην περίπτωση ασθενών από τους οποίους η συναίνεση δεν ισχύει νομικά (π.χ. παιδιά).

1.2 Μεθοδολογία

1.2.1 Συγκέντρωση κλινικών – θεραπευτικών – εργαστηριακών δεδομένων

Σε κάθε συμμετέχοντα ασθενή συμπληρώνονταν ένα **τυποποιημένο αναλυτικό ηλεκτρονικό ερωτηματολόγιο και δημιουργούταν ένα ηλεκτρονικό αρχείο**. Η συλλογή αυτών των ηλεκτρονικών αρχείων αποτέλεσε την πρώτη πανελλήνια βάση δεδομένων ασθενών με ΚΑΟ. Οι ερωτήσεις ήταν κυρίως κλειστού τύπου με σκοπό την αξιόπιστη στατιστική μελέτη και όπου δεν ήταν εφικτό, χρησιμοποιήθηκαν ανοικτού τύπου ερωτήσεις. Το αναδρομικό ερωτηματολόγιο περιλάμβανε αναλυτικές ερωτήσεις σχετικά με:

- Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών (ηλικία, φύλο, διαμονή, επάγγελμα).
- Την ηλικία έναρξης της νόσου και τη θέση της πρώτης προσβολής, εφόσον το νόσημα είχε ξεκινήσει.
- Στοιχεία ανά όργανο-στόχο (δέρμα, πεπτικό, λάρυγγας) σε όλη τη διάρκεια της ζωής των ασθενών. Συγκεκριμένα, τη συνολική διάρκεια και τη χρονική αιχμή της κρίσης ανά όργανο και τη μέγιστη συχνότητα των κρίσεων ανά έτος και ανά όργανο, χωρίς ο ασθενής να λαμβάνει προφυλακτική αγωγή όπως π.χ. ανδρογόνα.
- Τον συχνότερο εκλυτικό παράγοντα των κρίσεων ΑΟ και τον ρόλο δυνητικά εκλυτικών παραγόντων όπως οι ιογενείς λοιμώξεις, η μηχανική κάκωση των ιστών, η σωματική ή η ψυχική καταπόνηση, οι οδοντιατρικές πράξεις και οι χειρουργικές επεμβάσεις.
- Την ύπαρξη πρόδρομων συμπτωμάτων των κρίσεων ΑΟ (συγκεκριμένα την περιγραφή τους, τη συχνότητα και τον χρόνο εμφάνισής τους).
- Το ιστορικό τραχειοτομιών ή διασωληνώσεων σε κρίσεις λάρυγγα και το συνολικό αριθμό κρίσεων λάρυγγα σε όλη τη ζωή τους.
- Πιθανώς λανθασμένες χειρουργικές επεμβάσεις, όπως αναίτιες σκωληκοειδεκτομές.

- Στις γυναίκες ασθενείς, την πορεία της νόσου κατά τη διάρκεια των κυήσεων και τη σχέση με τη λήψη αντισυλληπτικών και την έμμηνο ρύση.
- Τις τιμές του εργαστηριακού ελέγχου του συμπληρώματος στο αίμα κατά τη διάγνωση της νόσου, δηλαδή του C4 και του αντιγονικού και λειτουργικού προσδιορισμού του C1-INH, εφόσον υπήρχαν τέτοιες μετρήσεις. Εάν δεν υπήρχαν, καταγραφόταν μετρήσεις από κάποια άλλη χρονική στιγμή, υπό την προϋπόθεση ότι ο ασθενής δε λάμβανε ανδρογόνα τότε.
- Τη μακροχρόνια προφυλακτική αγωγή του ασθενούς με ανδρογόνα (ως τέτοια ορίσθηκε η συνεχόμενη λήψη ανδρογόνων για διάστημα άνω των 6 μηνών). Αναζητήθηκαν στοιχεία όπως ο συνολικός χρόνος θεραπείας, η συνήθης δόση των ανδρογόνων, οι ανεπιθύμητες ενέργειες αναλυτικά και αν ο ασθενής αναγκάστηκε να διακόψει ή να μειώσει τη δόση των ανδρογόνων λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών.
- Τη μακροχρόνια προφυλακτική αγωγή του ασθενούς με τρανεξαμικό οξύ (Transamin[®], Νικολακόπουλος Α.Ε.).
- Τη θεραπεία των κρίσεων με pdC1-INH (Berinert-P[®], CSL Behring) και ικατιμπάντη (Firazyr[®], Shire). Συγκεκριμένα, αν υπήρχε διαθεσιμότητα των φαρμάκων σε κάθε ασθενή, τις ανεπιθύμητες ενέργειες και την ικανότητα αυτοχορήγησής τους.
- Την επίδραση της νόσου σε διάφορες πτυχές της ζωής των ασθενών. Ειδικότερα την επίδραση του ΚΑΟ στην επαγγελματική και την οικογενειακή ζωή, στην παιδική ηλικία, στις κοινωνικές σχέσεις, στην πραγματοποίηση ταξιδιών, καθώς και στην πραγματοποίηση οδοντιατρικών ή χειρουργικών επεμβάσεων. Καταγράφηκαν προβλήματα όσον αφορά την αντιμετώπιση των κρίσεων ΑΟ στα επείγοντα περιστατικά στο νοσοκομείο, όπως και πιθανά προβλήματα προμήθειας των φαρμάκων. Επίσης καταγράφηκε η επίπτωση του ΚΑΟ στην ποιότητα της ζωής των ασθενών με τη χρήση οπτικής-αναλογικής δεκαδικής κλίμακας (visual analog scale).
- Σε κάθε οικογένεια δημιουργήθηκε ένα λεπτομερές **γενεαλογικό δέντρο** με τη βοήθεια των ασθενών, το οποίο είχε τους εξής στόχους: α) την αναζήτηση ασθενών με ΚΑΟ που δεν ήταν καταγεγραμμένοι και την περαιτέρω προσπάθεια επικοινωνίας μαζί τους, β) τον έλεγχο μελών της οικογένειας με πιθανό ΚΑΟ λόγω

συμβατού ιστορικού κρίσεων αλλά χωρίς εργαστηριακή διάγνωση, γ) την εντόπιση ασυμπτωματικών ατόμων με ΚΑΟ, κυρίως παιδιά ασθενών στα οποία δεν είχε γίνει εργαστηριακός έλεγχος, δ) τη διεξοδική αναζήτηση θανάτων ασθενών λόγω ΚΑΟ. Συγκεκριμένα καταγραφόταν η συγγένεια και το ονοματεπώνυμο του θανόντα, η ηλικία και η αιτία του θανάτου και ταξινομούταν σε βέβαιος λόγω ΚΑΟ ή πιθανός, ανάλογα με την τεκμηρίωση.

1.2.2 Μοριακή μελέτη για την ανίχνευση των υπό μελέτη πολυμορφισμών (PCR-RFLP Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms)

A. Αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά

Στο σύνολο των διεργασιών χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους πίνακες 7 και 8, αντίστοιχα.

B. Εκχύλιση και απομόνωση DNA

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού (DNA) έγινε με τη χρήση ειδικού, εμπορικά διαθέσιμου, kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Cat. No. 51104) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen). Το σύστημα απομόνωσης περιλάμβανε τέσσερις τύπους διαλυμάτων, η σύσταση των οποίων δεν αναφέρεται από την εταιρία. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στην απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA) από εμπύρηνα λευκοκύτταρα και στον περαιτέρω καθαρισμό του από πρωτεΐνες και άλατα στα επόμενα στάδια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 27.

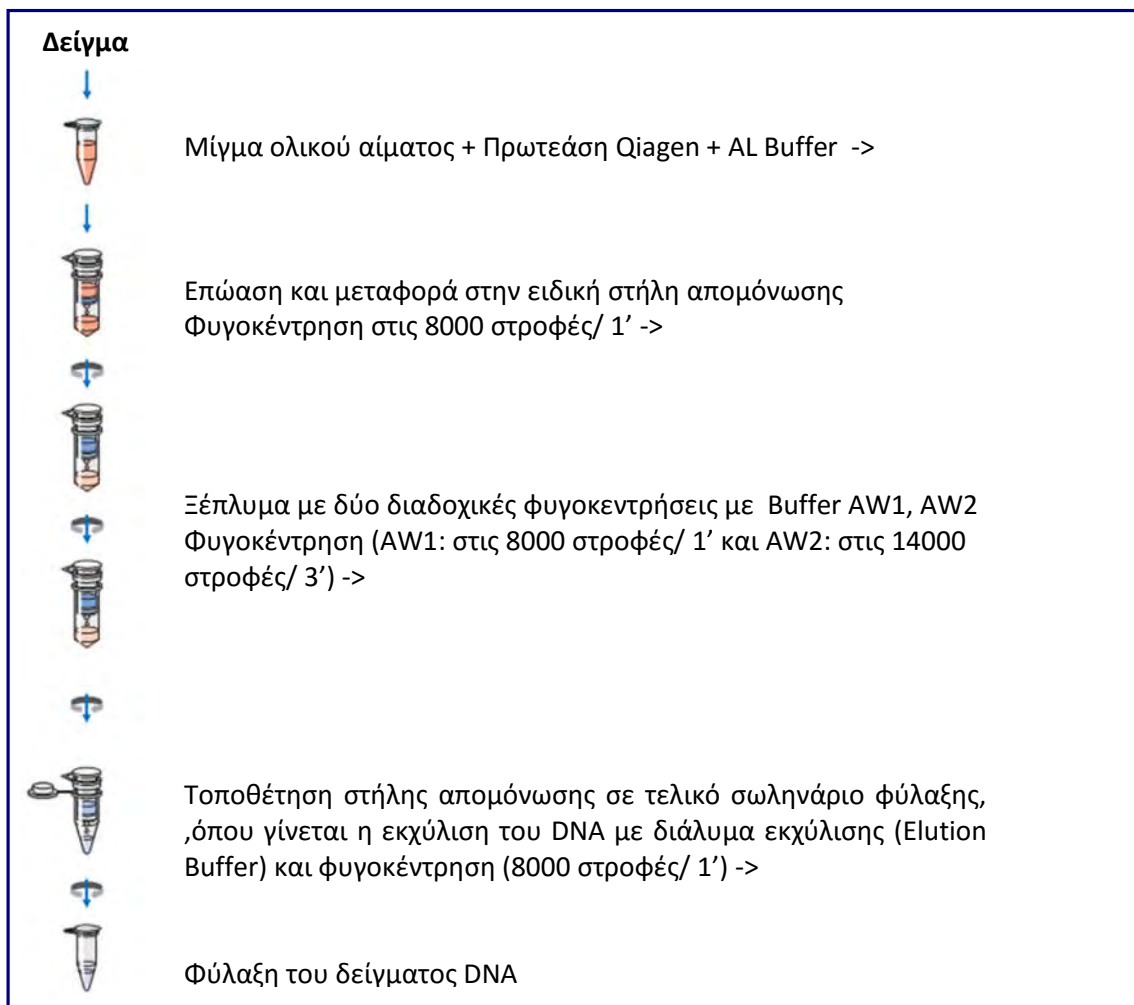
Αρχικά, από κάθε φιαλίδιο γενικής περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό K₃EDTA έγινε λήψη 200 μL, τα οποία προστέθηκαν σε σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1,5 ml που περιείχε 200 μL διαλύματος λύσης (AL lysis buffer) και 20 μL Qiagen πρωτεάσης. Σκοπός του ενζύμου αυτού είναι η απομάκρυνση κυτταρικών και ιστονικών πρωτεϊνών προσδεμένων στο DNA, μέσω της πέψης πεπτιδικών δεσμών σε αλειφατικά, αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα. Ακολούθησε ανάδευση (vortex) και επώαση του μείγματος σε υδατόλουτρο στους 56°C για 20 λεπτά.

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αριθ. Καταλόγου	Προέλευση
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	ET0016	Scharlau, Spain
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMOS.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 Ρηασών	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 Acil	Acil Restriction Enzyme	R0551S	New England Biolabs, USA
Περιοστική ενδονουκλεάση BsaHI	BsaHI Restriction Enzyme	R0556S	New England Biolabs, USA
Περιοριστική ενδονουκλεάση Hin1II	Hin1II Restriction Enzyme	ER1831	Thermo Fisher Scientific, USA
Πολυμεράση Taq	Taq DNA polymerase	18038-042	Invitrogen, UK
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	QiAquick PCR Purification Kit	28106	Qiagen, Germany
Kit εξαγωγής υλικού από γέλη	QiAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen, Germany
Kit εκχύλισης DNA	QiAamp DNA Blood Mini Kit	51104	Qiagen, Germany

Πίνακας 8. Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αριθ. 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 φωτόμετρου	Uvette 220-1600 nm	9520010051	Eppendorf, UK
Μπουκάλι 1000 mL	1L Storage bottles	430518	Corning, USA
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 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
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	Med Ex Supply, USA



Εικόνα 27. Σχηματικό διάγραμμα απομόνωσης γενομικού DNA με το σύστημα Qiagen Mini Blood (από <https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>)

Στη συνέχεια προστέθηκαν 200μL απόλυτης αιθανόλης 96-100% και κατόπιν συντελέστηκε μεταφορά του μείγματος σε ειδική στήλη (QiAamp Spin Column). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 1 λεπτό. Ακολούθησαν 2 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με τα διαλύματα AW1 και AW2 στις 8000 στροφές για 1 λεπτό και 14000 στροφές για 3 λεπτά, αντίστοιχα. Μέσω των προαναφερθέντων διαλυμάτων επιτεύχθηκε η απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων στοιχείων, που μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και περιεκτικότητα του DNA και κατ' επέκταση να παρεμποδίσουν πιθανά την PCR και άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Τέλος, προστέθηκαν 200 μL διαλύματος εκχύλισης AE (Elution Buffer) σε κάθε στήλη, ακολούθησε επώαση ενός λεπτού και τελική φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 1 λεπτό. Η συγκέντρωση του

DNA ήταν περίπου 50-200 ng/μL και η ποσότητα του ολικού DNA ήταν περίπου 6μg από 200μl περιφερικού αίματος. Τα δείγματα DNA μπορούσαν να διατηρηθούν στους 2-8°C για λίγες μέρες ή κατά προτίμηση σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως και έγινε στη δική μας περίπτωση. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, το DNA προσδιορίστηκε σε όλα τα δείγματα με τη χρήση του φωτόμετρου Bio Photometer (Erppendorf), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Γ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και πέψης με ένζυμα περιορισμού (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms, PCR-RFLP) για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών

Στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των *BDKRB1*, *F12*, *ACE* και *SERPING1* μέσω PCR. Οι αλληλουχίες των εκκινητών στις PCR αντλήθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και αποσκοπούσαν στην ενίσχυση των συγκεκριμένων αναγνωστικών πλαισίων, όπου εδράζονται οι πολυμορφισμοί που μας ενδιαφέρουν. Επιπρόσθετα για την ανίχνευση των πολυμορφισμών *BDKRB1* (-699G>C), *F12* - 5046T>C και *SERPING1* - 21963G>A πραγματοποιήθηκε πέψη (RFLP) των προϊόντων της PCR με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού *Acil* (New England Biolabs, USA), *BsaHI* (New England Biolabs, USA) και *Hin1II* (Thermo Fisher Scientific, USA).

Αναλυτικά:

Γ1. Ανίχνευση του πολυμορφισμού *BDKRB1* (-699G>C) (rs4905475)

Όπως αναφέρθηκε, ο πολυμορφισμός rs4905475 έχει ταυτοποιηθεί στη θέση -699G>C στην περιοχή του υποκινητή του *BDKRB1*. Η αλληλουχία που ενισχύθηκε ήταν ένα τμήμα 191bp από τη θέση -834 ως την -643, πριν τη θέση εκκίνησης της μεταγραφής του γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές από την μελέτη των Bachvaron et al.²⁶⁰ και παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Στοιχεία των ζευγών εκκινητών της αντίδρασης PCR για την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs4905475

Γονίδιο	Αλληλουχία	Μήκος (bp) προϊόντος PCR
BDKRB1	Forward primer: 5'-AGG GAA CAC AAG CAA AAG GC-3' (20bp) Reverse primer: 5'-CCA ACT GAA GGC CCC TTA C-3' (19bp)	191bp

Χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενομικού DNA, τα οποία ενισχύθηκαν σε αντίδραση PCR 30 μl. Ετοιμάστηκε ένα κύριο μείγμα και ένα μείγμα Taq πολυμεράσης με τα συστατικά που αναγράφονται στους Πίνακες 10 και 11. Για κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε ένα φιαλίδιο: 22 μl από το κύριο μείγμα, 6 μl από το μείγμα Taq πολυμεράσης και 2 μl DNA του δείγματος.

Πίνακας 10. Υλικά κύριου μείγματος για τη μελέτη του BDKRB1

Αντιδραστήριο	Όγκος
H ₂ O	242,5 μl
10x PCR Buffer	50 μl
dNTPs (2.5 mM)	40 μl
MgCl ₂ (100 mM)	7,5 μl
Primer F (50 pmol/μl)	10 μl
Primer R (50pmol/μl)	10 μl

Πίνακας 11. Υλικά μείγματος Taq πολυμεράσης

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

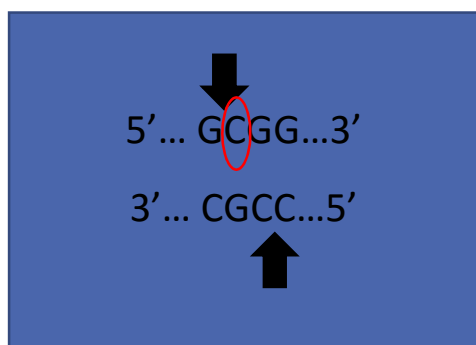
Στον Πίνακα 12 παρατίθενται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου της PCR. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε σωληνάρια της Corning (Corning Cat. No. 6571) σε θερμοκυκλοποιητές Robo-cycler Gradient 96 Stratagene. Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και φωτογραφήθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπως περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια. Κατά τη διεξαγωγή της PCR ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων και σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό (blank), με σκοπό να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Οι ίδιες βασικές αρχές ακολουθήθηκαν και σε όλες τις επόμενες αντιδράσεις των μελετώμενων γονιδίων.

Πίνακας 12. Συνθήκες της PCR στη μελέτη του πολυμορφισμού BDKRB1 -699G>C

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	94°C	2min
Αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	45sec
Υβριδισμός (Annealing)	60°C	45sec
Επέκταση (Extension)	72°C	45sec
Τελική επέκταση (Final Extension)	72°C	5min

} 38 κύκλοι

Το ένζυμο *Acil* (New England Biolabs, USA), αναγνωρίζει και πέπτει την αλληλουχία που φαίνεται στην Εικόνα 28, όπως επί παρουσίας του C αλληλομόρφου στον πολυμορφισμό BDKRB1 -699G>C²⁶⁰ :



Εικόνα 28. Η αλληλουχία δίκλωνου DNA που αναγνωρίζει και πέπτει το ένζυμο *Acil*

Ετοιμάστηκε το μείγμα πέψης σύμφωνα με τον πίνακα 13.

Πίνακας 13. Μείγμα πέψης με *Acil*

Αντιδραστήριο	Όγκος
dH ₂ O	145μl
10x NEBuffer 3	30μl
<i>Acil</i> ένζυμο (10U/μl)	10μl

Για την πέψη 6μl του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν 9μl του μείγματος πέψης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η επώαση του μείγματος σε υδατόλουτρο στους 37°C για τουλάχιστον δύο ώρες (εύρος 2-16 ώρες). Ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 3.0%. Στην ηλεκτροφόρηση, επί απουσίας του πολυμορφισμού ανιχνεύεται μία δέσμη προϊόντος PCR στις 191bp (άπεπτο προϊόν PCR), σε περίπτωση ομοζυγωτίας παρατηρούνται δύο δέσμες στις 134 και 57bp και σε ετεροζυγωτία ανιχνεύονται τρεις δέσμες στις 191, 134 και 57bp. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα, στα οποία είχε επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την τεχνική της ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων (sequencing). Επίσης στις ηλεκτροφορήσεις των επόμενων πολυμορφισμών χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα θετικά δείγματα επιβεβαιωμένα με παρόμοιο τρόπο.

Γ2. Ανίχνευση του πολυμορφισμού *F12- 5046T>C (rs1801020)*

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του *F12- 5046T>C* προέρχονται από την μελέτη των Zito et al. και παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.^{189, 370} Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενομικού DNA που ενισχύθηκαν σε αντίδραση PCR 30 μl. Στην αντίδραση PCR του *F12* προστέθηκε επιπλέον και DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο), γιατί το ποσοστό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων G-C είναι μεγαλύτερο από 60% και η παρουσία DMSO βοηθά στην καλύτερη αποδιάταξη των δύο αλύσων DNA.

Πίνακας 14. Στοιχεία του ζεύγους εκκινήτων, πρόσθιου (F) και οπίσθιου (R), της αντίδρασης PCR για τον πολυμορφισμό F12- 5046T>C

Γονίδιο	Αλληλουχία	Μήκος (bp) προϊόντος PCR
F12	Forward primer: 5'-GAT AGG CAG CTG GAC CAA CG-3' (20bp)	142bp
	Reverse primer: 5'-TGA TAG CGA CCC CCC AGA AC-3' (20bp)	

Ετοιμάστηκε ένα κύριο μείγμα και ένα μείγμα Taq πολυμεράσης με τα συστατικά που περιγράφονται στους Πίνακες 15 και 11, αντίστοιχα. Για κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε ένα φιαλίδιο: 22 μl από το κύριο μείγμα, 6 μl από το μείγμα Taq πολυμεράσης και 2 μl DNA του δείγματος.

Πίνακας 15. Υλικά κύριου μείγματος για τη μελέτη του F12

Αντιδραστήριο	Όγκος
H ₂ O	199,3 μl
10x PCR Buffer	50 μl
dNTPs (2.5mM)	40 μl
MgCl ₂ (100mM)	7,5 μl
Primer F (50 pmol/μl)	10 μl
Primer R (50pmol/μl)	10 μl
DMSO	43,2

Στον Πίνακα 16 παρατίθενται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου της PCR. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε σωληνάρια της Corning (Corning Cat. No. 6571) και σε θερμοκυκλοποιητές Robo-cycler Gradient 96 Stratagene. Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και φωτογραφήθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπως περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

Πίνακας 16. Συνθήκες της PCR στη μελέτη του πολυμορφισμού F12-5046T>C (rs1801020)

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	94°C	2min
Αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	30sec
Υβριδισμός (Annealing)	55°C	30sec
Επέκταση (Extension)	72°C	30sec
Τελική επέκταση (Final Extension)	72°C	5min

} 34 κύκλοι

Το ένζυμο *Bsa*HI (New England Biolabs, USA) αναγνωρίζει και πέπτει την wild-type αλληλουχία (GACGCC) του F12 (Εικόνα 29). Αντίθετα δεν υφίσταται πέψη από το ένζυμο, όταν υπάρχει το T αλληλόμορφο (GATGCC).³⁷⁰



Εικόνα 29. Η αλληλουχία δίκλωνου DNA που αναγνωρίζει και κατατέμνει το ένζυμο *Bsa*HI (όπου R=A ή G, Y=C ή T).

Ετοιμάστηκε το μείγμα πέψης σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα 17:

Πίνακας 17. Μείγμα πέψης με *Bsa*HI

Αντιδραστήριο	Όγκος
dH ₂ O	145μl
10x NEBuffer 4	30μl
<i>Bsa</i> HI ένζυμο (10U/μl)	10μl

Για την πέψη 6μl του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν 9μl του μείγματος πέψης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση του μείγματος σε υδατόλουτρο στους 37°C για τουλάχιστον 16 ώρες. Ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3.0%. Αναλυτικά κατά την ηλεκτροφόρηση, σε περίπτωση T ομοζυγωτίας παρατηρείται μία δέσμη στα 142bp. Επί απουσίας του πολυμορφισμού T το προϊόν των 142bp πέπτει σε δύο προϊόντα των 116 και 26bp (οι 26bp δε γίνονται ορατές σε γέλη αγαρόζης). Σε ετεροζυγώτες φορείς ανιχνεύονται δύο δέσμες στις 142 και 116 μετά την ηλεκτροφόρηση.

Γ3. Ανίχνευση του πολυμορφισμού ACE I/D (rs1799752)

Χρησιμοποιήθηκε ειδική PCR για την ενίσχυση των αλληλίων I και D στο γονιδίωμα. Συγκεκριμένα, η υπό μελέτη αλληλουχία DNA ενισχύεται μέσω PCR με ένα ζεύγος εκκινητών (MWG Biotech, Eberberg, Germany), η αλληλουχία των οποίων απεικονίζεται στον Πίνακα 18 και προέρχεται από τη μελέτη των Turet et al.³⁷¹ Οι εκκινητές αυτοί παράγουν προϊόντα 490bp και 190bp που αντιστοιχούν στο I και D αλληλόμορφο, αντίστοιχα.

Πίνακας 18. Στοιχεία ζεύγους εκκινητών, πρόσθιος (F) και οπίσθιος(R) για την μελέτη του πολυμορφισμού ACE I/D

Γονίδιο	Αλληλουχία	Μήκος (bp) προϊόντος PCR
ACE	Forward primer: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' (24bp)	490 bp και 190bp I και D
	Reverse primer: 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3' (25bp)	αλληλόμορφο αντίστοιχα

Για την PCR αντίδραση στον πολυμορφισμό αυτό ετοιμάστηκε ένα κύριο μείγμα και ένα μείγμα Taq πολυμεράσης με τα συστατικά που αναφέρονται στους Πίνακες 19

και 11 αντίστοιχα. Για κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε ένα φιαλίδιο 22 μl από το κύριο μείγμα, 6 μl από το μείγμα Ταq πολυμεράσης και 2 μl DNA του δείγματος.

Πίνακας 19. Υλικά κύριου μείγματος για τη μελέτη του ACE I/D

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

Στον Πίνακα 20 παρατίθενται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου της PCR για τη μελέτη του πολυμορφισμού ACE I/D. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε σωληνάρια της Corning (Corning Cat. No. 6571) και σε θερμοκυκλοποιητές Robo-cycler Gradient 96 Stratagene. Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και φωτογραφήθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Πίνακας 20. Συνθήκες της PCR στη μελέτη του πολυμορφισμού ACE I/D

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	94°C	3min	
Αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	30sec	} 33 κύκλοι
Υβριδισμός (Annealing)	59°C	30sec	
Επέκταση (Extension)	72°C	45sec	
Τελική επέκταση (Final Extension)	72°C	5min	

Γ4. Ανίχνευση του πολυμορφισμού *SERPING1*-21963G>A V480M (rs4926)

Χρησιμοποιήθηκαν εκκινήτες που αντλήθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν των Speletas et al.⁷ Στον Πίνακα 21

παρουσιάζονται η αλληλουχία και το μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR, όπως και το μήκος του προϊόντος του *SERPING1* που ενισχύθηκε.

Πίνακας 21. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του πολυμορφισμού *SERPING1* – V480M

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	Μήκος (bp) προϊόντος PCR
SEPRING1	Πρόσθιος: 5'-AAC CCA GAG AAT TCA GGA CAA AG--3' (23bp)	632bp
	Οπίσθιος: 5'- AAA AAC AAA GGC AAA GCA GAG A -3' (22bp)	

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενομικού DNA που ενισχύθηκαν σε αντίδραση PCR 30 μl. Ετοιμάστηκε ένα κύριο μείγμα και ένα μείγμα Taq πολυμεράσης με τα συστατικά που περιγράφονται στους Πίνακες 22 και 11, αντίστοιχα. Για κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε ένα φιαλίδιο: 22 μl από το κύριο μείγμα, 6 μl από το μείγμα Taq πολυμεράσης και 2 μl DNA του δείγματος.

Πίνακας 22. Υλικά κύριου μείγματος για η μελέτη του *SERPING1*

Αντιδραστήριο	Όγκος
H ₂ O	235 μl
10x PCR Buffer	50 μl
dNTPs (2.5 mM)	40 μl
MgCl ₂ (100 mM)	15 μl
Primer F (50 pmol/μl)	10 μl
Primer R (50pmol/μl)	10 μl

Στον Πίνακα 23 παρατίθενται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου της PCR για τη μελέτη του πολυμορφισμού V480M. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε σωληνάρια της Corning (Corning Cat. No. 6571) και σε θερμοκυκλοποιητές Robo-cycler

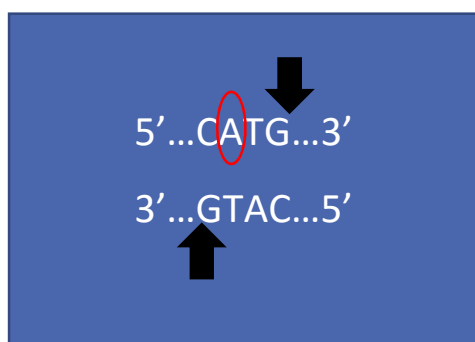
Gadient 96 Stratagene. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και φωτογραφήθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Πίνακας 23. Συνθήκες της PCR στη μελέτη του πολυμορφισμού V480M του SERPING1

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	94°C	2min
Αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	45sec
Υβριδισμός (Annealing)	58°C	45sec
Επέκταση (Extension)	72°C	45sec
Τελική επέκταση (Final Extension)	72°C	5min

} 30 κύκλοι

Στην εικόνα 30 φαίνεται η αλληλουχία δίκλωνου DNA που αναγνωρίζει και κατατέμνει το ένζυμο *Hin1II* (Thermo Fisher Scientific, USA).



Εικόνα 30. Η αλληλουχία δίκλωνου DNA που αναγνωρίζει και κατατέμνει το ένζυμο *Hin1 II*

Πίνακας 24. Μείγμα πέψης με *Hin1II*

Αντιδραστήριο	Όγκος
dH ₂ O	140μl
10x Buffer G	30μl
<i>Hin1II</i> ένζυμο (5U/μl)	10μl

Ετοιμάστηκε το μείγμα πέψης σύμφωνα με τον Πίνακα 24. Για την πέψη 6μl του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν 9μl του μείγματος πέψης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η επώαση του μείγματος σε υδατόλουτρο στους 37°C για τουλάχιστον 8 ώρες. Ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 2.5%. Αναλυτικά κατά την ηλεκτροφόρηση, επί απουσίας του πολυμορφισμού ανιχνεύονται δύο δέσμες στις 265 και 207bp. Σε περίπτωση ομοζυγωτίας του πολυμορφισμού το προϊόν των 265bp πέπτει σε 2 προϊόντα των 226 και 39bp (οι 39bp δε γίνονται ορατές σε γέλη αγαρόζης). Σε ετεροζυγώτες φορείς ανιχνεύονται μετά την ηλεκτροφόρηση τρεις δέσμες στις 265, 226 και 207bp.

Δ. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων της PCR καθώς και ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης έγιναν ορατοί με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης, στις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, επί παρουσίας ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE (*Invitrogen, UK*). Στο πήκτωμα προστέθηκε επιπλέον διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0.5 ng/ml, το οποίο αποτέλεσε την φθορίζουσα χρωστική. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει τη δυνατότητα να διεισδύει ανάμεσα στις βάσεις του DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Σε κάθε ένα από τα δείγματα προστέθηκε επίσης ειδική χρωστική (loading dye) σε αναλογία 1/10 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (10μl δείγματος, 1μl χρωστική), έτσι ώστε να διακρίνεται η μετακίνηση τους στο πήκτωμα. Στη συνέχεια το κάθε μείγμα τοποθετήθηκε στο πήκτωμα στα 120V και 400mA για 50 έως 70 λεπτά. Για τον υπολογισμό του μεγέθους, τόσο των προϊόντων PCR όσο και προϊόντων πέψης, χρησιμοποιήθηκε ως κλίμακα γνωστού μεγέθους, ο μάρτυρας DNA E-Gel Low Range Ladder (100-2000bp) (*Invitrogen, UK*). Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, Serial No. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gelcapture' (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap.

E. Καθαρισμός των προϊόντων PCR προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, σχετικά με την παρουσία των γενετικών παραλλαγών που μελετήθηκαν, έγινε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων κατόπιν καθαρισμού των προϊόντων PCR, σε πάνω από 30 δείγματα για κάθε πολυμορφισμό. Χρησιμοποιήθηκαν τυχαία αλλά και επιλεγμένα δείγματα, τόσο θετικά, ως προς την παρουσία των εν λόγω πολυμορφισμών, όσο και αρνητικά. Πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη αλληλούχιση με τη χρήση του Big Dye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems) και του γενετικού αναλυτή αλληλουχίας βάσεων ABI Prism 7100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Pure Link PCR Purification kit (Invitrogen, Cat. No. K3100-01), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμεράσης και αλάτων, προκειμένου τα προϊόντα να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για ανάλυση αλληλουχίας βάσεων. Αναλυτικότερα: Προστέθηκαν 4 όγκοι Binding Buffer (B2), αναμείχθηκαν και μεταφέρθηκαν στις ειδικές στήλες «Pure Link Spin», οι οποίες περιέχουν μεμβράνη, έτσι ώστε να γίνει προσρόφηση του DNA μέσω του διαλύματος PBI, το οποίο και εξασφαλίζει την απαιτούμενη συγκέντρωση αλάτων και pH. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 1 λεπτό και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει αιθανόλη (Washing buffer) και φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 1 λεπτό. Ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 3 λεπτά, χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν αιθανόλης από τα τοιχώματα της στήλης. Τέλος, η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1.5mL, προστέθηκαν 30 μL διαλύματος εκχύλισης (E1 buffer), παρέμεινε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιήθηκε τελική φυγοκέντρηση στα 13000 στροφές για 2 λεπτά. Για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητας των προϊόντων PCR που απομονώθηκαν, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, με μεθοδολογία που περιεγράφηκε αναλυτικά παραπάνω. Το καθαρισμένο δείγμα DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την πραγματοποίηση της ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων. Ενίοτε χρησιμοποιήθηκε και καθαρισμός των προϊόντων PCR από τη γέλη με τη χρήση του QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Cat. No. 28706) σύμφωνα με

τις οδηγίες του κατασκευαστή και με παρεμφερές πρωτόκολλο με αυτό του Pure Link PCR Purification kit.

1.3 Στατιστική ανάλυση

Στις ποιοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 για τη σύγκριση συχνοτήτων μεταξύ δύο ομάδων και η δοκιμασία one-way ANOVA για τη σύγκριση περισσότερων των δύο ομάδων. Όπου δεν ήταν εφαρμόσιμη η δοκιμασία χ^2 , δηλαδή όταν ο αριθμός των παρατηρήσεων σε ένα κελί ήταν μικρότερος από 5, χρησιμοποιήθηκε το Fisher's Exact test. Για τη σύγκριση της συχνότητας των πολυμορφισμών στους ασθενείς με ΚΑΟ και στον πληθυσμό των υγιών μαρτύρων χρησιμοποιήθηκε το Goodness of fit χ^2 . Για τον έλεγχο της κανονικότητας του πολυμορφισμού σύμφωνα με την εξίσωση Hardy-Weinberg εφαρμόστηκε το χ^2 με ένα βαθμό ελευθερίας.

Στις ποσοτικές μεταβλητές ο έλεγχος της κανονικότητας έγινε με την δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov και το Q-Q plot. Στις ποσοτικές μεταβλητές, για τη σύγκριση μεταξύ δύο ομάδων και ανάλογα με την κανονικότητα ή όχι της μεταβλητής, εφαρμόστηκε το παραμετρικό t-test ή το μη παραμετρικό Mann-Whitney test αντίστοιχα. Για περισσότερες των δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε το παραμετρικό one-way ANOVA ή το μη παραμετρικό Kruskal-Wallis και πάλι ανάλογα με την κανονικότητα ή όχι της μεταβλητής.

Για τη μελέτη της συσχέτισης δύο ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Pearson και η συσχέτιση Spearman's rank αντίστοιχα στην περίπτωση μη κανονικότητας μια εκ των δύο μεταβλητών. Το όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε ως $p < 0.05$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού IBM® SPSS® Statistics Version 20.0.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1. Το ΚΑΟ στην Ελλάδα

2.1.1 Η συχνότητα του ΚΑΟ στην Ελλάδα

Στην καταγραφή, την οποία πραγματοποιήσαμε πανελλαδικά, εντοπίσαμε 128 άτομα από 42 οικογένειες με ΚΑΟ με ανεπάρκεια C1-INH (I και II) (συχνότητα 1:84.000) και 3 άτομα από μία οικογένεια με ΚΑΟ με φυσιολογικό C1-INH.

2.1.2 Γεωγραφική κατανομή των γνωστών με ΚΑΟ ασθενών στην Ελλάδα



Εικόνα 31. Γεωγραφική κατανομή των ασθενών βάση της διαμονής τους ανά νομό

Στην Εικόνα 31 φαίνεται ότι περιοχές της χώρας παρουσιάζουν μικρή καταγραφή ασθενών ΚΑΟ αναλογικά με τους πληθυσμούς τους, όπως η δυτική Θράκη, η Κεντρική Μακεδονία, ένα μεγάλο τμήμα της Θεσσαλίας, η δυτική Στερεά Ελλάδα, η ανατολική Πελοπόννησος και η νησιωτική χώρα.

2.2 Κλινικά - εργαστηριακά - θεραπευτικά δεδομένα των ασθενών της μελέτης

Σε 85 από τους 128 ασθενείς, που προέρχονταν από 34 οικογένειες, έγινε καταγραφή με τη χρήση **αναλυτικού ερωτηματολογίου** και ελήφθη περιφερικό αίμα για τον **προσδιορισμό των πολυμορφισμών** των ενζύμων του συστήματος κινινών-καλικρεΐνης. Οι 85 ασθενείς διακρίθηκαν αρχικά σε δύο ομάδες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι κλινικής νόσου, δηλαδή της παρουσίας ΑΟ από τα όργανα-στόχους. Έτσι 77 ασθενείς είχαν κρίσεις ΑΟ, ενώ 8 ασθενείς ήταν ασυμπτωματικοί, αν και έφεραν

Πίνακας 25. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

Αριθμός ατόμων και οικογενειών που μελετήθηκαν	85/34	
Φύλο (άρρενες/ θήλεα, %)	46/39 (54.1%/45.9%)	
Ηλικία ανάλυσης σε έτη (μέση τιμή, εύρος τιμών)	35.9 (1-80)	
Ασθενείς με κλινική νόσο (n, %)	77/85, 90.6%	
Ηλικία έναρξης σε έτη (μέση τιμή, διάμεση, εύρος τιμών)	12.1, 10 (1-57)	
Ηλικία διάγνωσης σε έτη (μέση τιμή, εύρος τιμών)	29 (2-78)	
Καθυστέρηση διάγνωσης σε έτη (μέση τιμή, εύρος τιμών)	17.5 (0-58)	
Ασθενείς με οίδημα λάρυγγα (n,%)	44, 57.1%	
Ασθενείς με κρίσεις πεπτικού (n,%)	<i>Σπάνιες κρίσεις</i>	21 (27.3%)
	<i>Συχνές κρίσεις</i>	32 (41.6%)
	<i>Κυρίως κρίσεις</i>	24 (31.2%)
Ασθενείς χωρίς κλινική νόσο αλλά με μετάλλαξη στο <i>SERPING1</i> (n,%)*	8/85, 9.4%	
Ηλικία γονιδιακής διάγνωσης σε έτη (μέση τιμή, εύρος τιμών)	5.25 (1-16)	

μετάλλαξη στο *SERPING1* (Πίνακας 25). Τα συνοπτικά δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης φαίνονται στον Πίνακα 25. **Στο Παράρτημα I της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται αναλυτικά τα γενεαλογικά δέντρα των οικογενειών που μελετήθηκαν.**

2.2.1 Φύλο και ηλικία ασθενών

Από τα 85 ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη, 46 ήταν άνδρες (54%) και 39 γυναίκες (46%) και έτσι το φύλο δε φαίνεται να επηρεάζει την κληρονομικότητα στο ΚΑΟ (σωματική επικρατούσα κληρονομικότητα). Η κατανομή των ασθενών μας για τις ηλικιακές ομάδες 0-20, 21-40, 41-60 και >61 ετών, ήταν αντίστοιχα: 17, 34, 19, και 15 ασθενείς.

2.2.2 Τύπος κληρονομικού αγγειοιδήματος

Από τις 34 οικογένειες στις οποίες ολοκληρώθηκε ο γενετικός έλεγχος, οι 30 οικογένειες με 73 ασθενείς έπασχαν από ΚΑΟ τύπου I (88.2% του συνόλου των οικογενειών), ενώ οι 4 οικογένειες με 12 ασθενείς έπασχαν από ΚΑΟ τύπου II (11.8%)(Πίνακας 26). Σε σύγκριση τα αντίστοιχα ποσοστά στη διεθνή βιβλιογραφία είναι παραπλήσια, περίπου 85% και 15% αντίστοιχα.⁶³ Στις 4 οικογένειες με ΚΑΟ τυ-

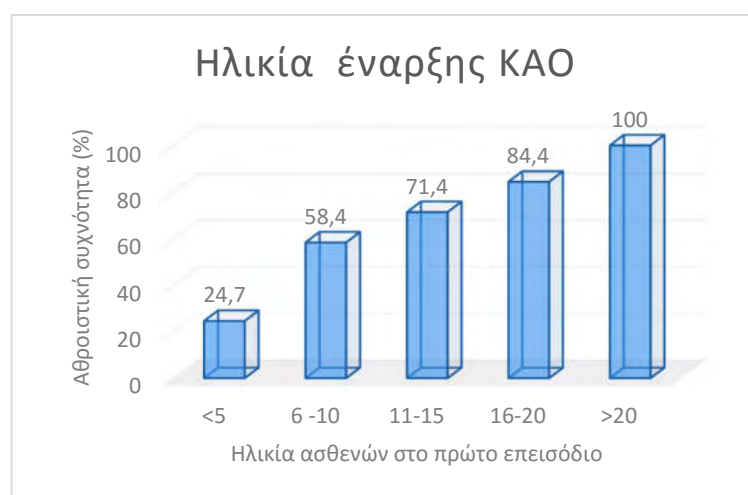
Πίνακας 26. Ταξινόμηση των οικογενειών του ΚΑΟ βάσει του τύπου του ΑΟ και της ύπαρξης οικογενειακού ιστορικού

Οικογένειες με τύπου I ΚΑΟ (n,%)	30/34, 88.2%
Ασθενείς με τύπου I (n,%)	73/85, 85.9%
Οικογένειες με τύπου II ΚΑΟ (n,%)	4/34, 11.8%
Ασθενείς με τύπου II (n,%)	12/85, 14.1%
Οικογένειες με de novo μετάλλαξη (n,%)	11/34, 32.4%

που II, η μετάλλαξη ήταν παρερμηνεύσιμη και αφορούσε το εξόνιο 8, που διαμορφώνει το ενεργό ενζυμικό κέντρο του C1-INH. Σε 11 από τις 34 οικογένειες (32.4%) διαπιστώθηκε **de novo μετάλλαξη**, δηλαδή χωρίς οικογενειακό ιστορικό και σε σύνολο 11 από τους 85 ασθενείς (12.9%) (Πίνακας 26).

2.2.3 Ηλικία έναρξης του ΚΑΟ και θέση της πρώτης προσβολής

Στα άτομα με κλινική νόσο, η μέση ηλικία έναρξης του ΚΑΟ ήταν τα 12.1 έτη και η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου ήταν τα 29.0 έτη, όπως φαίνεται στον Πίνακα 25. Στο 50% των 77 συμπτωματικών ασθενών η νόσος είχε ξεκινήσει μέχρι την ηλικία των 10 ετών (διάμεση τιμή 10 έτη, 1-57). Αναλυτικά η μικρότερη ηλικία έναρξης ήταν το πρώτο έτος ζωής σε ένα ασθενή και το δεύτερο έτος σε τρεις ασθενείς. Από την άλλη, σε τρεις ασθενείς υπήρξε όψιμη έναρξη της νόσου μετά από τα 30 έτη (31, 32 και 57 ετών). Παρατηρήθηκε επίσης μια σχετικά καθυστερημένη έναρξη της νόσου στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, αλλά δεν έφτανε σε στατιστική σημαντικότητα (12.8 vs 11.3 έτη, $p=0.74$). Το συμπέρασμα είναι ότι **η νόσος ξεκινά κατά κανόνα μέσα στις δύο πρώτες δεκαετίες της ζωής για την πλειονότητα των πασχόντων** (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. Η ηλικία των ασθενών στο αναφερόμενο πρώτο επεισόδιο στη ζωή τους

Σε 62 από τα 77 ασθενείς, που μπορούσαν να ανακαλέσουν τη σχετική πληροφορία στο θυμικό τους, η θέση της πρώτης προσβολής ήταν το πεπτικό

σύστημα για τους μισούς ασθενείς (50.0%, 31/62) και το δέρμα στους υπόλοιπους (46.8%, 29/62), ενώ ένας ασθενής παρουσίασε ταυτόχρονα ΑΟ στο πεπτικό και στο δέρμα ως πρώτη εκδήλωση (1.6%, 1/62). Επίσης σε **ένα μόνο άτομο αναφέρθηκε έναρξη του ΚΑΟ με προσβολή του λάρυγγα (1.6%, 1/62).**

2.2.4 Καθυστέρηση στη διάγνωση του ΚΑΟ

Ο μέσος χρόνος καθυστέρησης της διάγνωσης της νόσου στην Ελλάδα ήταν τα 17.5 έτη. Στους 77 ασθενείς η διάγνωση ήταν από άμεση ως και με καθυστέρηση 58 ετών. Έχει όμως αυξηθεί ο αριθμός των ατόμων που διαγιγνώσκονται με ΚΑΟ τα τελευταία έτη, ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία μεταξύ 2005 και 2015 όπως φαίνεται στην Εικόνα 33.



Εικόνα 33. Ετήσιος αριθμός νέων διαγνώσεων ΚΑΟ στο διάστημα 1978-2013 στην Ελλάδα

2.2.5 Συχνότητα προσβολής των διαφόρων οργάνων και διάρκεια των κρίσεων ΑΟ

Στον Πίνακα 27 φαίνεται η συχνότητα προσβολής των διαφόρων οργάνων καθ' όλη τη ζωή των ασθενών της μελέτης και η σύγκριση με τη διεθνή βιβλιογραφία.⁶⁶⁻⁶⁸ Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών 98.7% και 88.3% είχε ΑΟ στο

δέρμα και στο πεπτικό, αντίστοιχα, καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Επίσης το 57.1% (44/77) των ασθενών παρουσίασε ένα τουλάχιστον ΑΟ στο λάρυγγα. Υπήρχαν και μικρές υποομάδες με κρίσεις αποκλειστικά και μόνο στο δέρμα 5.9% και αποκλειστικά και μόνο στο πεπτικό 1.3%, ενώ δεν υπήρχε ασθενής με κρίσεις αποκλειστικά και μόνο στον λάρυγγα. Η διάρκεια των κρίσεων του ΑΟ ήταν κατά μέση τιμή 35 ώρες στον λάρυγγα, 51 ώρες στο πεπτικό και 56 ώρες στο δέρμα. Ο μέσος χρόνος, όπου το ΑΟ έφτανε στην κορυφαία χειρότερη στιγμή από την έναρξή του, ήταν 4.8 ώρες στον λάρυγγα, 7.4 ώρες στο πεπτικό και 11.6 ώρες στο δέρμα, αντίστοιχα.

Πίνακας 27. Συχνότητα προσβολής των διαφόρων συστημάτων των ασθενών κατά τη διάρκεια της ζωής τους και σύγκριση με τη διεθνή βιβλιογραφία ⁶⁶⁻⁶⁸

	ΕΛΛΑΔΑ	ΔΙΕΘΝΩΣ
Οίδημα λάρυγγα	57.1% (44/77)	~50%
Οίδημα πεπτικού σωλήνα	88.3% (68/77)	70-80%
Οίδημα δέρματος	98.7% (76/77)	~95%

Για τη στατιστική ανάλυση και τη συσχέτιση, **όσον αφορά τις κρίσεις ΑΟ από το πεπτικό, οι κρίσεις αυτές ταξινομήθηκαν** σε: α) σπάνιες (rare) κρίσεις, όταν ήταν <2/έτος, β) σε συνήθεις (common), όταν ήταν πιο συχνές και περίπου στην ίδια συχνότητα με τις κρίσεις στο δέρμα και γ) σε κατά κύριο λόγο από το πεπτικό (mainly), όταν οι κρίσεις εντοπιζόνταν κατά κανόνα στο πεπτικό σύστημα και υπερτερούσαν έναντι των άλλων κρίσεων. Με βάση την ταξινόμηση αυτή η σχετική συχνότητα της κάθε ομάδας κρίσεων ΑΟ του πεπτικού ήταν 27.3%, 41.6% και 31.2% αντίστοιχα (Πίνακας 25).

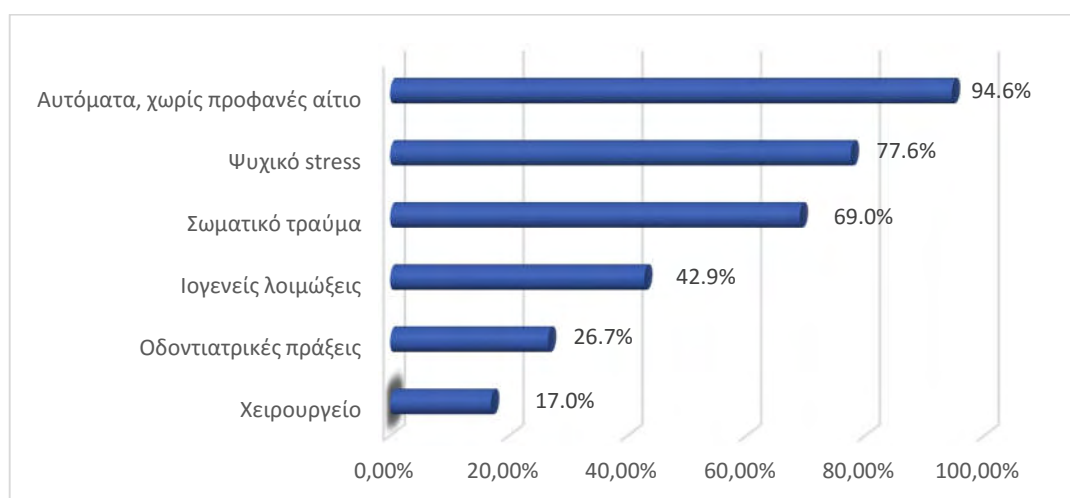
2.2.6 Επιπλοκές της νόσου (τραχειοτομία, εσφαλμένα χειρουργεία, θάνατοι)

Διασωλήνωση ή τραχειοτομία είχαν υποστεί οι 6 από 36 ασθενείς με οιδήματα λάρυγγα (16.7%). Επίσης το 23.5% (16/68) των ασθενών με κρίσεις ΑΟ στο πεπτικό **είχε χειρουργηθεί εσφαλμένα με διάγνωση «οξείας κοιλίας»**. Σε στοιχεία

από 34 οικογένειες υπήρξαν 12 **θάνατοι από οίδημα λάρυγγα** (6 βέβαιοι και άλλοι 6 πιθανολογούμενοι από το ιστορικό), δηλαδή περίπου ένας θάνατος ανά 3 οικογένειες ασθενών με ΚΑΟ και από αυτούς μόνο οι 2 ήταν σε ασθενείς ήδη διαγνωσμένους, τονίζοντας την αναγκαιότητα της έγκαιρης διάγνωσης.

2.2.7 Εκλυτικά αίτια κρίσεων ΚΑΟ και πρόδρομα συμπτώματα

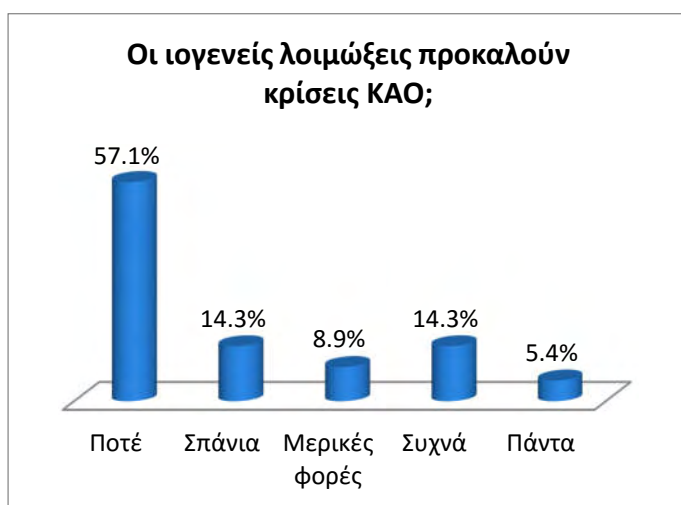
Στους 70 ενήλικους και συμπτωματικούς ασθενείς οι αναφερόμενες εκλυτικές συνθήκες των κρίσεων ΑΟ ήταν κυρίως το έντονο ψυχικό στρες (77.6%), οι σωματικοί τραυματισμοί (69%) και οι ιογενείς λοιμώξεις (42.9%) (Εικόνα 34). Όμως σχεδόν όλοι οι ασθενείς ανέφεραν ότι παρουσίασαν και κρίσεις ΑΟ **χωρίς προφανή λόγο** (94.6%) και έτσι απροειδοποίητα ξεκινούσε η πλειοψηφία των κρίσεων ΑΟ στον λάρυγγα ειδικότερα.



Εικόνα 34. Εκλυτικοί παράγοντες των κρίσεων ΚΑΟ στους ασθενείς της μελέτης

Για την πλειοψηφία των ασθενών (58.1%) υπήρξε συσχέτιση μεταξύ του βαθμού έντασης της μηχανικής κάκωσης στο δέρμα (τραύμα ή πίεση) και της πιθανότητας εμφάνισης ΑΟ στο σημείο εκείνο, αλλά όχι πάντα. Το 42.9% των ασθενών **συσχέτισαν τις ιογενείς λοιμώξεις με τις κρίσεις ΚΑΟ**, σε άλλοτε άλλο βαθμό (Εικόνα 35). Έτσι από τα παραπάνω φαίνεται ότι και άλλοι άγνωστοι

παράγοντες τροποποιούν τη σχέση μεταξύ κάθε εκλυτικού αιτίου και της πιθανότητας εμφάνισης ΑΟ.



Εικόνα 35. Γράφημα της σχέσης των ιογενών λοιμώξεων και των κρίσεων ΚΑΟ

Στο ΚΑΟ σε ορισμένους ασθενείς εμφανίζονται συμπτώματα, τα οποία και προειδοποιούν ότι η κρίση θα ξεκινήσει. **Πρόδρομα των κρίσεων συμπτώματα** καταγράφηκαν στο 50% (35/70) των ασθενών και αυτά ήταν: κόπωση – αίσθημα κακουχίας στο 51.4% (18/35), δακτυλιοειδές ερύθημα (erythema marginatum) στο 40% (14/35), και ναυτία-ανορεξία στο 22.9% (8/35). Τα πρόδρομα συμπτώματα εμφανιζόταν στο 62.0% των ασθενών μέχρι 24 ώρες και στο υπόλοιπο 38.0% από 24 ως 72 ώρες πριν την έναρξη του επεισοδίου.

2.2.8 Βαρύτητα της νόσου

Καταγράφηκε η μέγιστη συχνότητα των επεισοδίων του ΚΑΟ κατά τη διάρκεια της ζωής των 77 ασθενών και κατά συστήματα. Η καταγραφή αφορούσε το μέγιστο αριθμό επεισοδίων ΑΟ ανά έτος και χωρίς οι ασθενείς να λαμβάνουν ανδρογόνα (τα οποία μειώνουν τον αριθμό των κρίσεων ΚΑΟ) (Πίνακας 28). Έτσι οι μισοί ασθενείς ανέφεραν τουλάχιστον 2 επεισόδια από το λάρυγγα ανά έτος, 12 από το πεπτικό και 8 από το δέρμα. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι νόσος η εμφανίζεται συχνά και επηρεάζει σαφέστατα τη ζωή ενός μεγάλου πληθυσμού ασθενών.

Πίνακας 28. Ετήσια μέγιστη συχνότητα των κρίσεων ΚΑΟ ανά σύστημα

	Επεισόδια λάρυγγα/έτος	Επεισόδια πεπτικού/έτος	Επεισόδια στο δέρμα/έτος
Διάμεση τιμή	2	12	8
Μέση τιμή	2.8	18.3	16.1
Ελάχιστη	1	1	1
Μέγιστη	12	75	140

Από τους ασθενείς με κρίσεις ΑΟ στο λάρυγγα το 17.6% (6/34) είχε πάνω από 20 κρίσεις σε όλη τη ζωή τους, δηλαδή είχαν συχνές και δυνητικά θανατηφόρες κρίσεις ΑΟ. Στην πλειοψηφία των ασθενών 66.7% (22/34) **το οίδημα εμφανίζεται κατευθείαν και άμεσα στο λάρυγγα**, χωρίς προειδοποίηση από προηγούμενο εξωτερικό γειτονικό οίδημα. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό ασθενών 17.6% (6/34) είχε συνήθως έναρξη του ΑΟ πρώτα εξωτερικά, σε γειτονική περιοχή του λάρυγγα. Στο υπόλοιπο 17.6% (6/34) των ασθενών η κλινική εικόνα ήταν μεικτή, με κρίσεις να ξεκινούν άλλοτε από το εξωτερικό δέρμα και άλλοτε απευθείας στον λάρυγγα.

2.2.9 Ορμονικές μεταβολές και κρίσεις ΚΑΟ στις γυναίκες

Το 29.6% (8/27) των συμπτωματικών γυναικών με έμμηνο ρύση ανέφερε σχέση κρίσεων ΑΟ και **έμμηνου ρύσης**, κυρίως περιεμμηνορυσιακή επιδείνωση. Τα **αντισυλληπτικά** επιδείνωσαν τη νόσο στο 40% (2/5) των γυναικών που τα είχαν λάβει. Σε σύνολο 29 **κυήσεων** σε 16 ασθενείς (στις οποίες είχε ήδη ξεκινήσει το νόσημα πριν από την πρώτη κύηση και μπορούσαν να θυμηθούν την πορεία της νόσου κατά την κύηση) το ΚΑΟ ήταν βελτιωμένο στο 75.8% των κυήσεων και επιδεινούμενο στο 24.2%.

2.2.10 Εργαστηριακά ευρήματα της νόσου - Τιμές C4 και C1INH (ποσοτικός και λειτουργικός)

Στον Πίνακα 29 φαίνονται οι τιμές του συμπληρώματος C4, C1-INH αντιγονικού και C1-INH λειτουργικού που μετρήθηκαν και ήταν διαθέσιμες από το ιστορικό σε 43 ασθενείς. Η συχνότητα των κρίσεων ΑΟ δε φάνηκε να σχετίζεται με τη συγκέντρωση του C4 στο αίμα (σε μετρήσεις που έγιναν μεταξύ των επεισοδίων ΑΟ), ούτε με το μέγεθος της ενζυμικής ανεπάρκειας του C1-INH στη νόσο στους ασθενείς της μελέτης.

Πίνακας 29. Εργαστηριακές τιμές C4 και C1-INH στον ορό των ασθενών ανά τύπο ΚΑΟ. Παρουσιάζεται η μέση τιμή και η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή στις παρενθέσεις.

	C4 (mg/dl)	C1inh (mg/dl)	Λειτουργικός C1inh
ΚΑΟ τύπου I	5.6 (1.7-13)	5.7 (1.2-11)	44.6% (18% -70%)
ΚΑΟ τύπου II	5.7 (3-7.2)	69 (33-95)	45.4% (28% -62%)

2.2.11 Θεραπευτικά δεδομένα της νόσου στην Ελλάδα

Σε μια προσπάθεια αποτύπωσης της σύγχρονης Ελληνικής πραγματικότητας καταγράφηκε η θεραπεία του ΚΑΟ. Συγκεκριμένα:

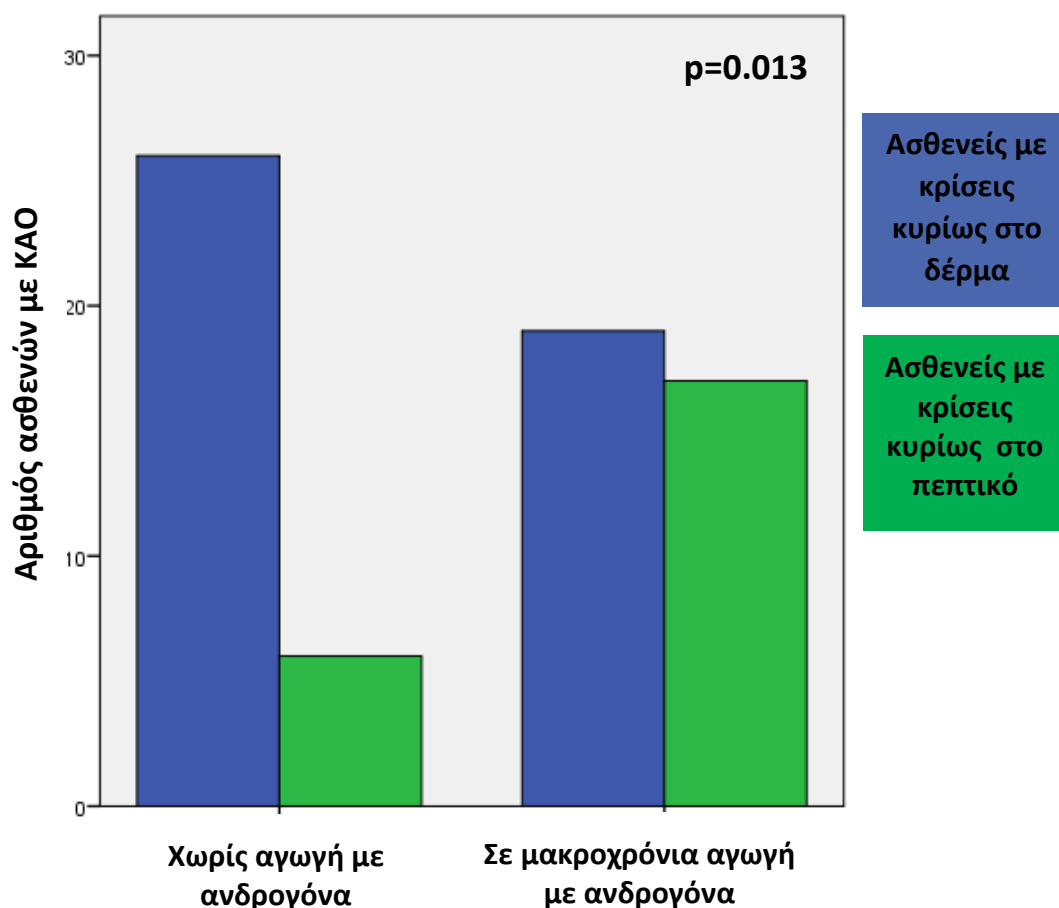
- A. Θεραπείες για το οξύ επεισόδιο ΚΑΟ
- Ο ανθρώπινος παράγοντας rdC1-INH είχε συνταγογραφηθεί στο 71.4% (55/77) των ασθενών και η ικατιμπάντη, η οποία έχει ένδειξη σε ενήλικες, είχε συνταγογραφηθεί στο 68.6% (48/70) των ενηλίκων ασθενών αντίστοιχα.
 - **Στο 10.4% των ασθενών (8/77) όμως δεν υπήρχε διαθέσιμο κανένα από τα δύο φάρμακα τη στιγμή της καταγραφής.**
 - Σε όσους ασθενείς είχαν συνταγογραφηθεί τα φάρμακα οξείας κρίσης, τα ποσοστά των εκπαιδευμένων ασθενών σε αυτοχορήγηση ήταν 10.9% (6/55) για τον παράγοντα C1-INH και 72.9% (35/48) για την ικατιμπάντη.

- Η αυτοχορήγηση φαινόταν να είναι ευπρόσδεκτη από όλους σχεδόν τους ασθενείς 97.4% (75/77).
- Όσον αφορά τις ανεπιθύμητες ενέργειες: ένας μόνο ασθενής ανέφερε ήπια κεφαλαλγία με τον rdC1-INH, ενώ για την ικατιμπάντη σχεδόν όλοι οι ασθενείς ανέφεραν τοπική ερυθρότητα, καύσο και πόνο στην περιοχή της υποδόριας ένεσης. Κανείς όμως δεν ανέφερε ότι οι ανεπιθύμητες ενέργειες θα τον οδηγούσαν στην απόφαση να μην επαναλάβει τη χορήγηση των συγκεκριμένων φαρμάκων και έτσι φαίνεται ότι οι θεραπείες αυτές ήταν καλά ανεχτές από τους ασθενείς.

B. Μακροχρόνια προφύλαξη των ασθενών με ΚΑΟ

Το 55.7% (39/70) των ασθενών που ήταν και ενήλικες και συμπτωματικοί, ανεξαρτήτως φύλου, είχε λάβει ανδρογόνα από 6 μήνες μέχρι 32 έτη. Η μέση ημερήσια δόση των ανδρογόνων (δαναζόλη) ήταν 100mg. Το 41.4% (12/29) των πασχόντων γυναικών είχε λάβει μακροχρόνια ανδρογόνα και το 65.9% (27/41) των πασχόντων ανδρών. Η σχέση της μακροχρόνιας θεραπείας με το φύλο δεν έφτασε σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας, σε όλες τις γυναίκες ανεξαρτήτου ηλικίας ($p=0.25$), όπως και στην υποομάδα της κύριας αναπαραγωγικής ηλικίας (>18 και <45 ετών) ($p=0.078$).

Η χρήση των ανδρογόνων δε σχετιζόταν σε στατιστικά σημαντικά βαθμό με τον συνολικό αριθμό των κρίσεων λάρυγγα ($p=0.20$). Αντίθετα η χρήση τους αυξανόταν στην ομάδα ασθενών, οι οποίοι είχαν κρίσεις κατά κύριο λόγο (mainly) από το πεπτικό, είτε συγκρίνοντας τρεις ομάδες (σπάνιες κοιλιακές κρίσεις έναντι συχνών κρίσεων έναντι κυρίως κρίσεων πεπτικού, $p=0.04$), είτε δύο ομάδες (ομάδα με περισσότερες κρίσεις από το πεπτικό έναντι ομάδας με περισσότερες κρίσεις από το δέρμα, $p=0.013$ - Εικόνα 36). Δηλαδή όσο στην κλινική εικόνα **κυριαρχούσαν οι κρίσεις από το πεπτικό**, τόσο αυτό οδηγούσε σε χρήση ανδρογόνων. Η στατιστική ανάλυση αφορούσε την ομάδα των ασθενών που μπορούσε να λάβει ανδρογόνα, δηλαδή σε ασθενείς άνω των 18 ετών.



Εικόνα 36. Χορήγηση μακροχρόνιας θεραπείας ανδρογόνων και κυριαρχία των κρίσεων ΑΟ του πεπτικού στο φαινότυπο της νόσου

Ανεπιθύμητες ενέργειες από τη δαναζόλη είχε το 66% (26/39) και ήταν δοσοεξαρτώμενες. Το 30.8% (8/26) επηρεαζόταν η ζωή του σε ικανό βαθμό από τις ανεπιθύμητες ενέργειες των ανδρογόνων και το 26.9% (7/26) είχε αναγκαστεί είτε να μειώσει ή να διακόψει τη χορήγηση των ανδρογόνων λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών. Στους 39 ασθενείς που λάμβαναν ανδρογόνα καταγράφηκαν οι κάτωθι ανεπιθύμητες ενέργειες με σειρά συχνότητας: υπερχοληστεριναιμία (38.5%), πρόσληψη βάρους (35.9%), κράμπες (30.8%), κεφαλαλγία (30.8%), μυαλγίες (28.2%), υπέρταση (23.1%), αύξηση ηπατικών ενζύμων (23.1%), αδυναμία (20.5%). Ειδικότερα στις 12 γυναίκες παρατηρήθηκαν: διαταραχές έμμηνου ρύσης (75%), υπερτρίχωση (58.3%), βράχος φωνής (25%), μείωση μεγέθους στήθους (16.7%) και στους 27 άνδρες: τριχόπτωση (33.3%), μείωση libido (25.9%) και διαταραχές στύσης (18.5%). Χρήση τρανεξαμικού είχε γίνει μόνο από ένα άτομο και με συνήθη παρενέργεια το κοιλιακό άλγος.

2.2.12 Επίδραση του ΚΑΟ σε πτυχές της ζωής των ασθενών

Καταγράφηκε τέλος και η επίπτωση του ΚΑΟ στην ζωή των ασθενών με τη χρήση οπτικής-αναλογικής δεκαδικής κλίμακας σε χαρτί (visual analog scale). Τα ακόλουθα δεδομένα ήταν διαθέσιμα σε 59 ασθενείς. Το ΚΑΟ επηρέασε τη ζωή των ασθενών από **μέτρια ως σοβαρά**, ακόμη και σε ήπιες κλινικά περιπτώσεις. Έτσι το 15.3% (9/59) βαθμολόγησε την επίδραση της νόσου από 1-3 (ήπια), το 62.7% (37/59) σε 4-7 (μέτρια) και το 22% (13/59) με 8-10 (σοβαρά). Η συνολική επίδραση του ΚΑΟ στη ζωή των ασθενών σχετιζόταν με το σύνολο του αριθμού των κρίσεων (Spearman's rho $p=0.001$, $r=0.54$). Άρα **το ΚΑΟ είναι ένα νόσημα που επηρεάζει σαφέστατα τη ζωή των ασθενών** και το σύνολο των επεισοδίων αποτελεί πιθανώς ένα μέτρο εκτίμησης της επίδρασης αυτής.

Στις οξείες κρίσεις ΚΑΟ το 61% των ασθενών φοβήθηκαν ότι δε θα υπάρχει διαθέσιμο φάρμακο ή ότι θα καθυστερήσει η αντιμετώπιση του ΑΟ στα επείγοντα (64.4%). Το 57.6% ζει με τον καθημερινό φόβο ότι μπορεί να κινδυνεύσει σε επόμενη κρίση. Αρκετοί (42.4%) είχαν συναντήσει δυσκολίες στην προμήθεια των φαρμάκων μέσω των ασφαλιστικών ταμείων και ένας στους τρεις (37.3%) είχε συναντήσει ιατρό απρόθυμο να τους χορηγήσει τα φάρμακα του ΚΑΟ κατά την κρίση. Αρκετοί (42.4%) ένοιωθαν φόβο για το Berinert-P® λόγω της πιθανότητας μετάδοσης κάποιου λοιμογόνου παράγοντα και ένα μικρότερο ποσοστό φοβόταν να λάβει Firazyr®, επειδή ήταν ένα σχετικά νέο φάρμακο (13.6%). Από αυτούς που είχαν ανεπιθύμητες ενέργειες με ανδρογόνα, αυτές επηρέαζαν την ποιότητα της ζωής τους στο 30.8%.

Μερικοί ασθενείς (22%) αρνήθηκαν να κάνουν τοπική ένεση με αναισθητικό σε οδοντιατρικές πράξεις, άλλοι (25.4%) πάλι καθυστερούν να πάνε στον οδοντίατρο ή να κάνουν απαιτούμενο χειρουργείο (20.3%). Στους μισούς σχεδόν έχει επηρεαστεί η κοινωνική ζωή τους (49.2%) ή δεν πάνε σε μακρινά ταξίδια λόγω φόβου σε περίπτωση κρίσης (49.2%). Σε αρκετές περιπτώσεις η νόσος διαταράσσει τις ενδοοικογενειακές σχέσεις, ειδικά με τον/την σύζυγο: 13.6%, με τους γονείς 6.8% ή και με τα παιδιά τους 15.3%. Οι μισοί (50.8%) φοβούνται ή φοβόντουσαν να κάνουν παιδιά. Κάποιοι έχουν χάσει την εργασία τους (16.9%) ή έχουν αλλάξει πόστο (6.8%) λόγω της νόσου.

Για τη παιδική και τη σχολική ζωή τους μπόρεσαν να απαντήσουν 32 ασθενείς. Συγκεκριμένα ανέφεραν ότι κατά την παιδική ηλικία το 50% είχε προβλήματα με απουσίες στο σχολείο, το 15.6% ένοιωθε μειονεκτικά και το 15.6% έκανε αθλήματα με μικρότερη σωματική καταπόνηση.

2.3 Συχνότητα των μελετώμενων πολυμορφισμών των ενζύμων κινινών-καλλικρεΐνης

Η μοριακή μελέτη για την ανίχνευση των πολυμορφισμών των γονιδίων της οδού των κινινών-καλλικρεΐνης ολοκληρώθηκε σε 85 ασθενείς από 34 οικογένειες με ΚΑΟ. Η μέση ηλικία των ασθενών κατά την ανάλυση των πολυμορφισμών ήταν τα 35.9 έτη (Πίνακας 25).

2.3.1 Πολυμορφισμός *BDKRB1*-(-699G>C) (rs4905475)

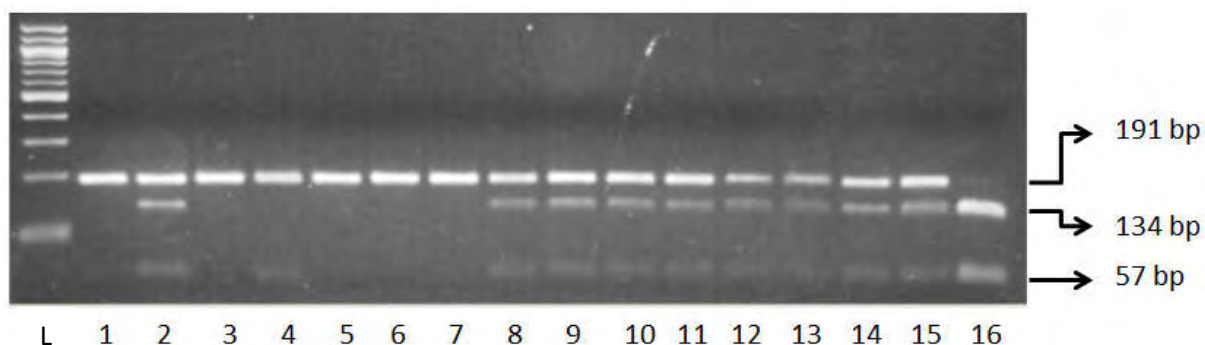
Από τους 85 ασθενείς με ΚΑΟ οι 10 (11.8%) ήταν ετερόζυγοι και κανένας ομόζυγος για το αλληλόμορφο του πολυμορφισμού *BDKRB1*-(-699G>C). Στην ομάδα των μαρτύρων είχαμε επίσης 13 ετερόζυγα άτομα και 1 ομόζυγο. Η ομάδα και των ασθενών και των μαρτύρων βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p=0.56$ και $p=0.52$ αντίστοιχα). Κατά τη σύγκριση της συχνότητας του πολυμορφισμού φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας του ΚΑΟ και των υγιών μαρτύρων ($p=0.45$), αλλά είναι λίγο μικρότερη από αυτή που αναφέρεται στην βιβλιογραφία (vs. 12.5%, $p=0.01$), ίσως λόγω ότι δεν έχει μελετηθεί ποτέ σε μεγάλο δείγμα για να είναι αξιόπιστη.²⁶¹ (Πίνακας 30).

Πίνακας 30. Τα αποτελέσματα της συχνότητας αλληλομόρφου του πολυμορφισμού *BDKRB1*-(-699G>C) σε ασθενείς με ΚΑΟ και υγιείς μάρτυρες δε διέφεραν στατιστικά

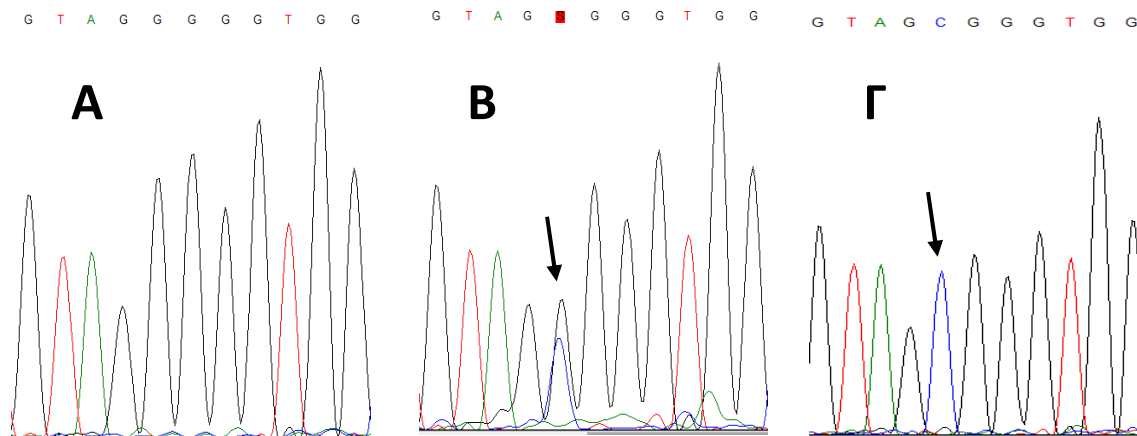
	Ασθενείς με ΚΑΟ (n=85)	Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=101)
Ομόζυγοι (G/G)	75 (88.2%)	87 (86.1%)
Ετερόζυγοι (G/C)	10 (11.8%)	13 (12.9%)
Ομόζυγοι (C/C)	0 (0%)	1 (0.9%)
Συχνότητα C αλληλομόρφου	5.9%	7.4%

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από PCR-RFLP κατά την ανίχνευση του *BDKRB1* - (-699G>C)

(Εικόνα 37), όπως και η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων που ακολούθησε σε αρκετά δείγματα για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας (Εικόνα 38).



Εικόνα 37. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με PCR-RFLP για την ανίχνευση του -699G>C του *BDKRB1*. Δείγματα 1, 3, 4, 5, 6, 7: άγριου τύπου (wild type), δείγμα 16: ομόζυγο, δείγματα 2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15: ετερόζυγα και L: κλίμακα ανίχνευσης μεγέθους. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αγαρόζης 3%.



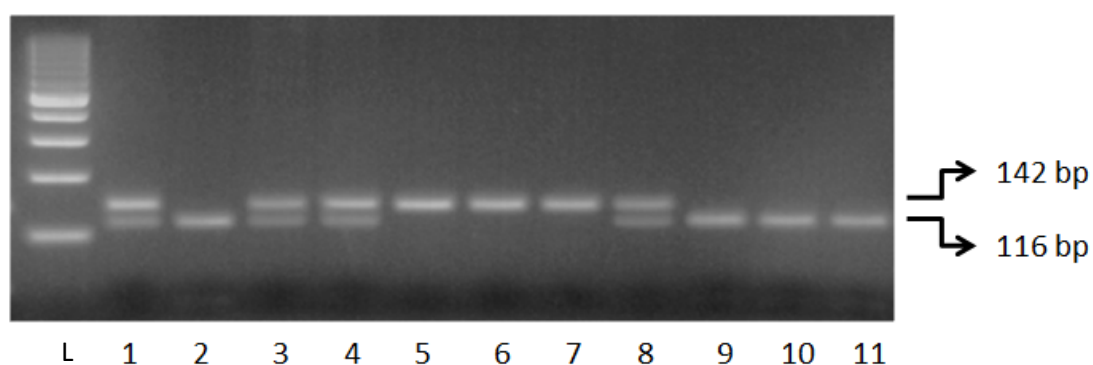
Εικόνα 38. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων, στην περιοχή του υποκινητή στο γονίδιο *BDKRB1*. A. Δείγμα με γονότυπο άγριου τύπου. B. Δείγμα με γονότυπο ετερόζυγο για τον πολυμορφισμό. Γ. Δείγμα με γονότυπο ομόζυγο για τον πολυμορφισμό.

2.3.2 Πολυμορφισμός *F12* - 5046T>C (rs1801020), *F12*-C46T

Από τους 85 ασθενείς με ΚΑΟ οι 20 (23.5%) ήταν ετερόζυγοι φορείς του πολυμορφισμού και κανένας ομόζυγος. Στην ομάδα των 101 μαρτύρων είχαμε 38 ετερόζυγους και 1 ομόζυγο για τον πολυμορφισμό του *F12* (Πίνακας 31). Η ομάδα και των ασθενών και των μαρτύρων βρισκόταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg, η δεύτερη ωστόσο οριακά ($p=0.22$ και $p=0.06$ αντίστοιχα). Κατά τη σύγκριση της συχνότητας επίπτωσης του πολυμορφισμού *F12*-C46T φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των υγιών μαρτύρων ($p=0.009$, goodness of fit test).

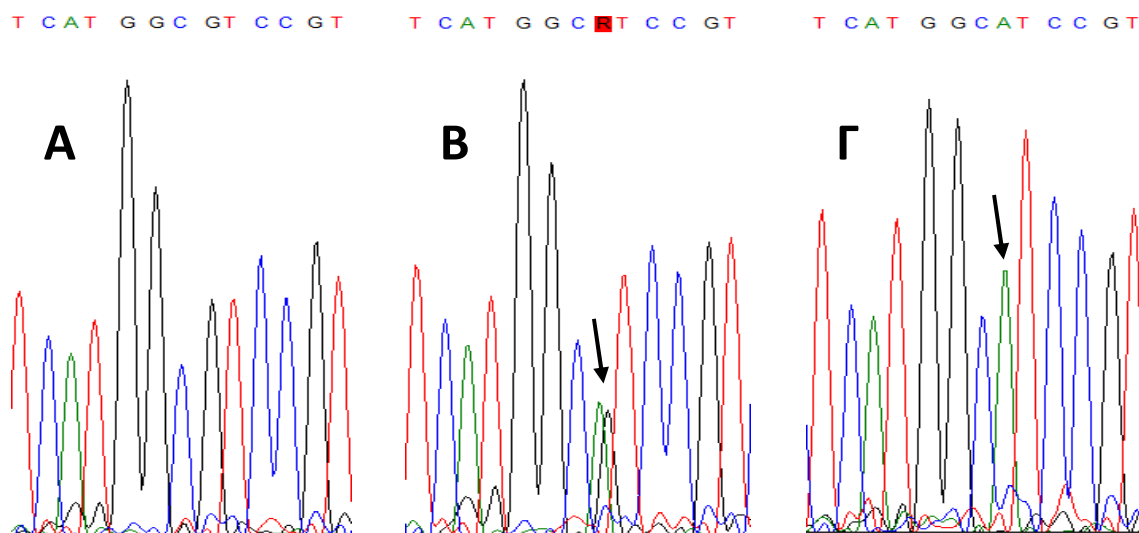
Πίνακας 31. Τα αποτελέσματα της συχνότητας αλληλομόρφου του πολυμορφισμού *F12*-C46T στους ασθενείς με ΚΑΟ και σε φυσιολογικούς μάρτυρες

	Ασθενείς με ΚΑΟ (n=85)	Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=101)
Ομόζυγοι (C/C)	65 (76.5%)	62 (61.4%)
Ετερόζυγοι (C/T)	20 (23.5%)	38 (37.6%)
Ομόζυγοι (T/T)	0 (0%)	1 (1%)
Συχνότητα T αλληλομόρφου	11.8%	19.8%



Εικόνα 39. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με PCR-RFLP, για την ανίχνευση του C46T πολυμορφισμού του γονιδίου *F12*. Δείγματα 2, 9, 10, 11: άγριου τύπου (wild type), δείγματα 1, 3, 4, 8: ετερόζυγα και δείγματα 5, 6, 7: ομόζυγα για τον πολυμορφισμό C46T, L: κλίμακα ανίχνευσης μεγέθους. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτική αγαρόζης 3%.

Στις εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από PCR-RFLP κατά την ανίχνευση του πολυμορφισμού *F12 – C46T* (Εικόνα 39), όπως και η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων που ακολούθησε σε αρκετά δείγματα για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας (Εικόνα 40).



Εικόνα 40. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων, στην περιοχή του υποκινητή στο *F12*. Η αλληλούχιση έχει γίνει με τον αντίστροφο εκκινητή. Α. Δείγμα με γονότυπο άγριου τύπου. Β. Δείγμα με γονότυπο ετερόζυγο για τον πολυμορφισμό. Γ. Δείγμα με γονότυπο ομόζυγο για τον πολυμορφισμό.

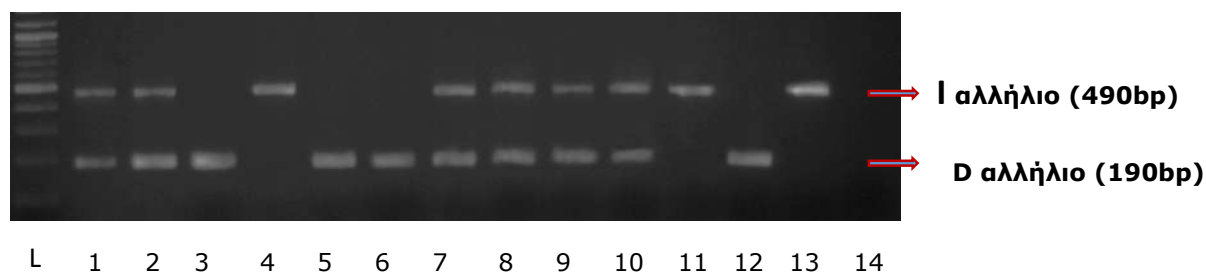
2.3.3 Πολυμορφισμός *ACE I/D* (rs1799752)

Στους ασθενείς με ΚΑΟ προέκυψε ότι το 42.4% (36/85) ήταν ετερόζυγοι και το 16.4% (14/85) ομόζυγοι για το I αλληλίο, ενώ για τους μάρτυρες τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 52.4% και 14.6%. Η συχνότητα του D και I αλληλίου ήταν 62.4% και 37.6% στην ομάδα των ασθενών με ΚΑΟ, ενώ στην ομάδα των μαρτύρων ήταν 59.2% και 40.8% αντίστοιχα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 32.

Πίνακας 32. Τα αποτελέσματα της συχνότητας των αλληλομόρφων I και D του ACE σε ασθενείς με ΚΑΟ και σε φυσιολογικούς μάρτυρες

	Ασθενείς με ΚΑΟ (n=85)	Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=103)
Ομόζυγοι (D/D)	35 (41.2%)	34 (33%)
Ετερόζυγοι (D/I)	36 (42.4%)	54 (52.4%)
Ομόζυγοι (I/I)	14 (16.4%)	15 (14.6%)
Συχνότητα D αλληλίου	62.4%	59.2%
Συχνότητα I αλληλίου	37.6%	40.8%

Η ομάδα και των ασθενών και των μαρτύρων βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p=0.37$ και $p=0.39$ αντίστοιχα). Παρατηρήσαμε ότι η συχνότητα των I και D αλληλίων δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά μεταξύ των ατόμων με ΚΑΟ και των υγείων μαρτύρων της μελέτης μας ($p = 0.4$) και δε διαφέρει από τη διεθνή βιβλιογραφία - συχνότητα I αλληλίου 40% ($p=0.53$).²⁹² Στην Εικόνα 41 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης των I και D αλληλίων του ACE σε ασθενείς με ΚΑΟ.



Εικόνα 41. Ηλεκτροφορητική κινητικότητα του D και I αλληλίου του ACE σε ασθενείς με ΚΑΟ. Δείγματα 4, 11, 13: ομόζυγα για το I αλλήλιο, δείγματα 1, 2, 7, 8, 9, 10: ετερόζυγα και δείγματα 3, 12: ομόζυγα για το D αλλήλιο (θέση 14 κενό και L: κλίμακα ανίχνευσης μεγέθους). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αγαρόζης 2%.

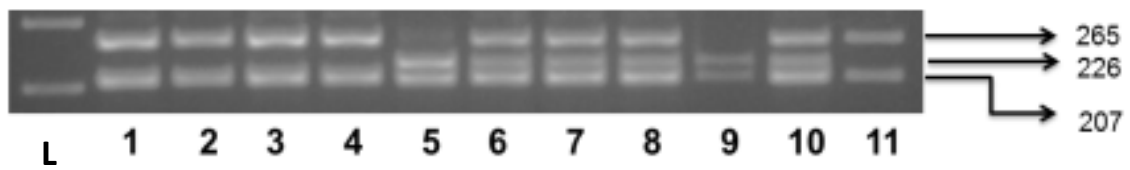
2.3.4 Πολυμορφισμός *SERPING1*-21963G>A (V480M, rs4926)

Σε 85 ασθενείς με ΚΑΟ υπήρξαν 26 (30.6%) ετερόζυγοι και 4 (4.7%) ομόζυγοι για το αλληλίο M480, με τη συχνότητα του αλληλίου να είναι 20.0% (Πίνακας 33). Η ομάδα και των ασθενών και των μαρτύρων βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p=0.68$ και $p=0.99$ αντίστοιχα). Η συχνότητα αυτή δε διαφέρει σημαντικά με την ομάδα των 108 υγιών μαρτύρων ($p=0.95$), όπου είχαμε 39 ετερόζυγα (36.1%) και 6 ομόζυγα άτομα (5.5%), όπως και με την αναφερόμενη 26.6% στη βιβλιογραφία σε Ευρωπαίους ($p=0.06$).³⁵⁹

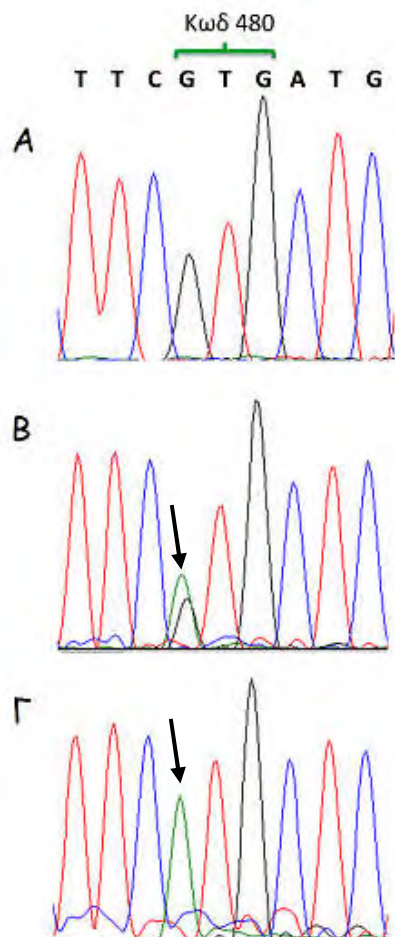
Πίνακας 33. Τα αποτελέσματα της συχνότητας του αλληλίου του πολυμορφισμού V480M σε ασθενείς με ΚΑΟ και σε φυσιολογικούς μάρτυρες

	Ασθενείς με ΚΑΟ (n=85)	Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=108)
Γονότυπος Val480	55 (64.7%)	63 (58.3%)
Γονότυπος Val480Met	26 (30.6%)	39 (36.1%)
Γονότυπος Met480	4 (4.7%)	6 (5.5%)
Συχνότητα αλληλίου M480	20%	19.8%

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από PCR-RFLP κατά την ανίχνευση του πολυμορφισμού V480M (Εικόνα 42), όπως και η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων που ακολούθησε σε αρκετά από τα δείγματα για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας (Εικόνα 43).



Εικόνα 42. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με *PCR-RFLP*, για την ανίχνευση του πολυμορφισμού στο κωδικίο 480. Δείγματα 5, 9: ομόζυγα για το αλληλίο M480, δείγματα 6, 7, 8, 10: ετερόζυγα και δείγματα 1, 2, 3, 4, 11: ομόζυγα για το αλληλίο V480. L: κλίμακα ανίχνευσης μεγέθους. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αγαρόζης 2%.



Εικόνα 43. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων, στην περιοχή του όγδου εξονίου στο γονίδιο στο *SERPING1* A. Δείγμα με γονότυπο Val480. B. Δείγμα με γονότυπο Val480Met. Γ. Δείγμα με γονότυπο Met480.

Στον Πίνακα 34 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης των πολυμορφισμών της μελέτης για τους ασθενείς με ΚΑΟ.

Πίνακας 34. Συνολικά η σχετική συχνότητα των πολυμορφισμών στο μελετώμενο πληθυσμό των Ελλήνων ασθενών με ΚΑΟ. *Οι αριθμοί στη στήλη αντιστοιχούν κατά σειρά σε γονότυπο άγριου τύπου, ετερόζυγο και ομόζυγο για κάθε πολυμορφισμό.

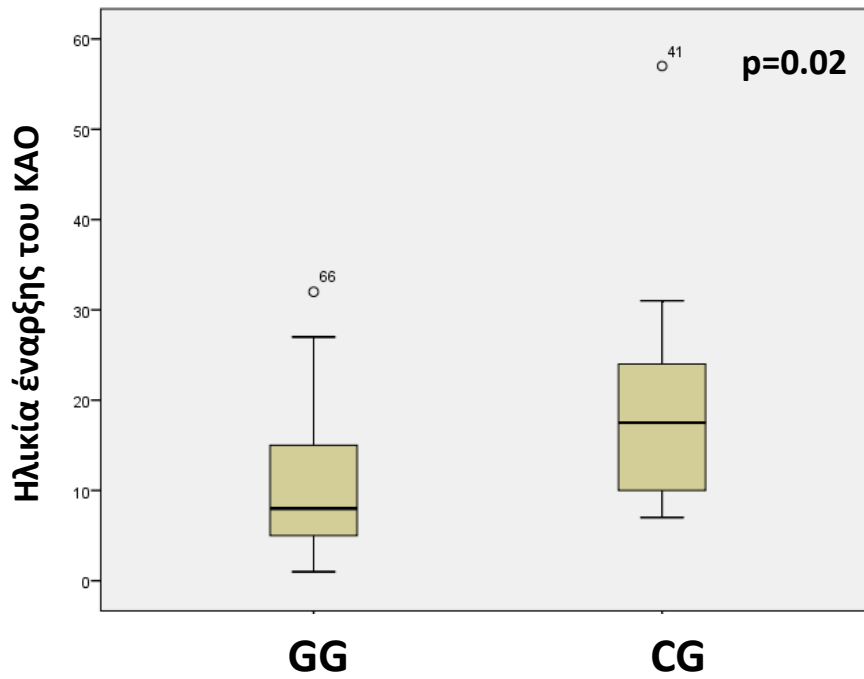
Ανάλυση πολυμορφισμών γονιδίων	Μελετήθηκαν 85 ασθενείς
<i>BDKRB1</i> -(-699G>C) πολυμορφισμός (n, %)	75 (88.2%), 10 (11.8%), 0 (0%)*
<i>F12</i> -C46T πολυμορφισμός (n, %)	65 (76.5%), 20 (23.5%), 0 (0%)*
<i>ACE</i> - I/D πολυμορφισμός (n, %)	35 (41.2%), 36 (42.4%), 14 (16.5%)*
<i>SERPING1</i> - V480M πολυμορφισμός (n, %)	55 (64.7%), 26 (30.6%), 4 (4.7%)*

2.4 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ΚΑΟ και πολυμορφισμοί των γονιδίων της οδού κινινών-καλλικρεΐνης

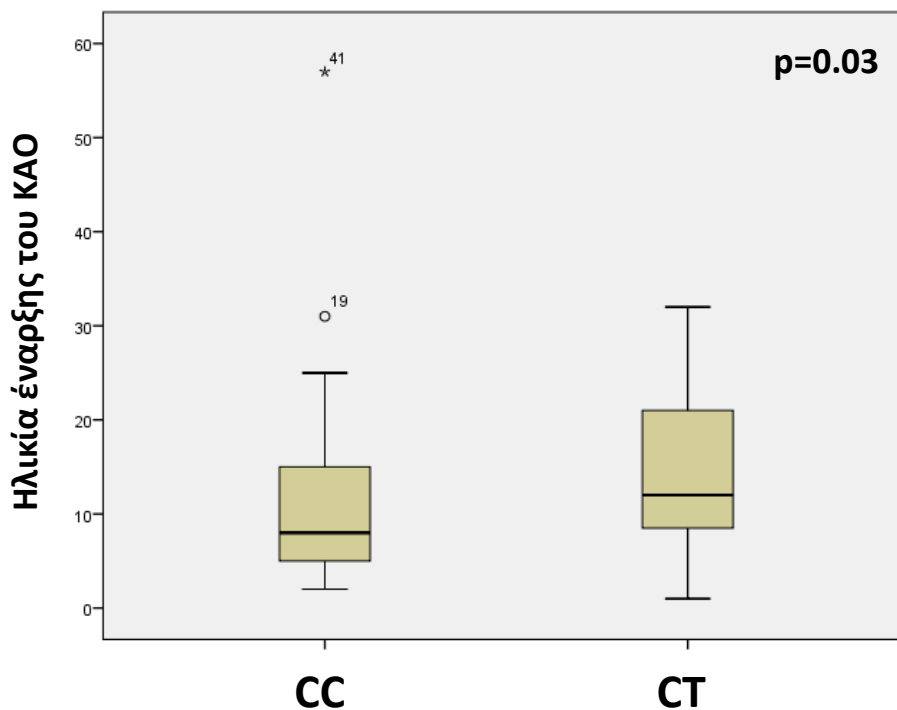
Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση της συσχέτισης των πολυμορφισμών των γονιδίων του συστήματος κινινών-καλλικρεΐνης που αναλύθηκαν, με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου σε όλους στους συμπτωματικούς ασθενείς με ΚΑΟ.

2.4.1 Ηλικία έναρξης του ΚΑΟ

Υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έναρξης του ΚΑΟ και: α) της παρουσίας του πολυμορφισμού **-699G>C** στο ***BDKRB1*** με καθυστέρηση της έναρξης της νόσου κατά μέση τιμή 9.4 έτη ($p=0.02$, Εικόνα 44) (GG : 10.9 έτη έναντι CG: 20.3 έτη) και β) της ύπαρξης του **C46T** στο ***F12*** με καθυστέρηση της έναρξης του ΚΑΟ κατά μέση τιμή 4.6 έτη ($p=0.03$, Εικόνα 45) (CC: 11.2 έναντι CT: 14.8 έτη). Καθώς στο μελετώμενο δείγμα ασθενών δεν υπήρχαν ομόζυγα άτομα για τους δύο αυτούς πολυμορφισμούς, δεν ήταν δυνατό να ελεγχθεί η πιθανή επίδραση της ομόζυγης κατάστασης στην ηλικία έναρξης του ΚΑΟ. Η ηλικία έναρξης αποτελεί σημαντικό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό, γιατί έχει φανεί ότι η καθυστέρηση της έναρξης του ΚΑΟ συσχετίζεται με ηπιότερη κλινική πορεία.^{71, 372}

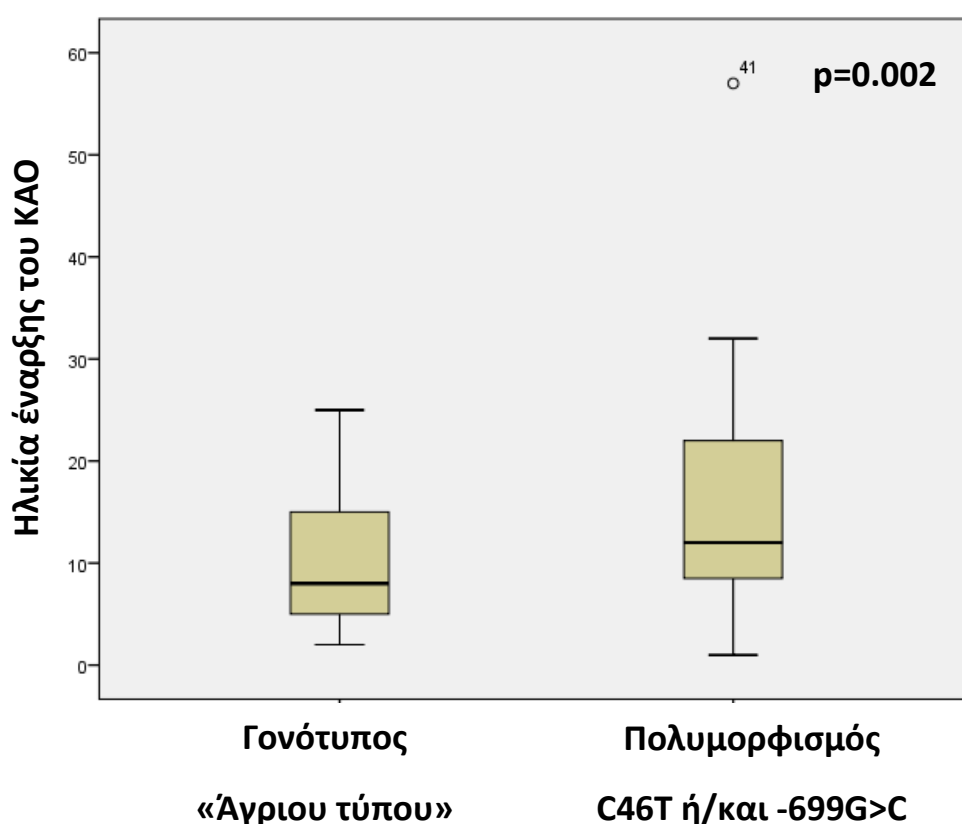


Εικόνα 44. Ηλικία έναρξης του ΚΑΟ στην ομάδα με το φυσικό γονότυπο και στην ομάδα με ένα τουλάχιστον αλληλόμορφο C στο BDKRB1



Εικόνα 45. Ηλικία έναρξης του ΚΑΟ στην ομάδα με το γονότυπο “άγριου τύπου» και στην ομάδα με ένα τουλάχιστον αλληλόμορφο T στο F12

Προχωρώντας ακόμη περισσότερο την στατιστική ανάλυση, η ύπαρξη ενός ή και των δύο πολυμορφισμών *F12-C46T* και *BDKRB1-(-699G>C)* οδηγούσε σε καθυστερημένη έναρξη της νόσου κατά 6.6 έτη συγκριτικά με την ομάδα με γονότυπο «άγριου τύπου» και στα δυο γονίδια (μέση τιμή 16.4 έτη έναντι 9.8 έτη) σε ακόμη υψηλότερο βαθμό στατιστικής σημαντικότητας ($p=0.002$, Εικόνα 46). Από την άλλη, η έναρξη της νόσου του ΚΑΟ δε σχετιζόταν με την ύπαρξη του πολυμορφισμού *SERPING1-V480M* ($p=0.51$) και του αλληλίου *ACE-I* ($p=0.73$).



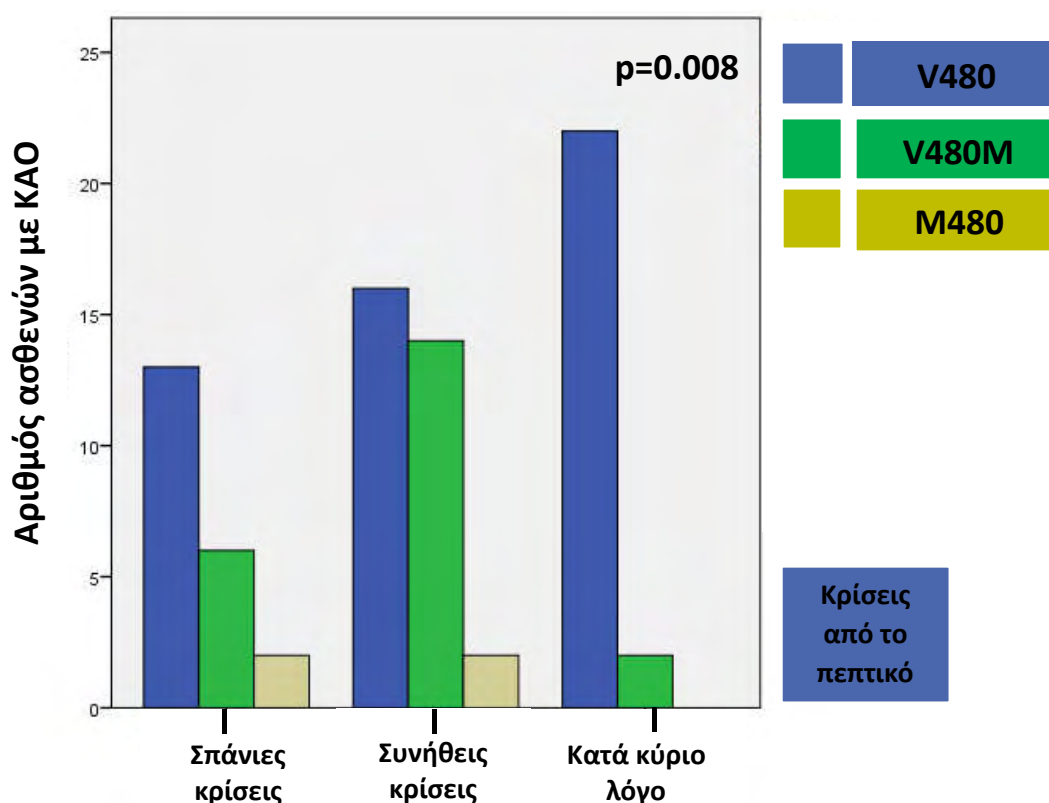
Εικόνα 46. Ηλικία έναρξης του ΚΑΟ στην ομάδα με ένα ή και με τους δύο πολυμορφισμούς (*F12 C46T* και *BDKRB1 -699G>C*) συγκριτικά με την ομάδα του ΚΑΟ με «άγριου τύπου» γονότυπο και στα δύο μελετώμενα γονίδια

2.4.2 Κρίσεις ΚΑΟ στον λάρυγγα

Η παρουσία των πολυμορφισμών *F12-C46T* ($p=0.32$), *BDKRB1-* (-699G>C) ($p=0.74$), *SERPING1-V480M* ($p=0.44$) και του αλληλίου I στο γονίδιο *ACE* ($p=0.32$) δε σχετιζόταν με τα οιδήματα στον λάρυγγα.

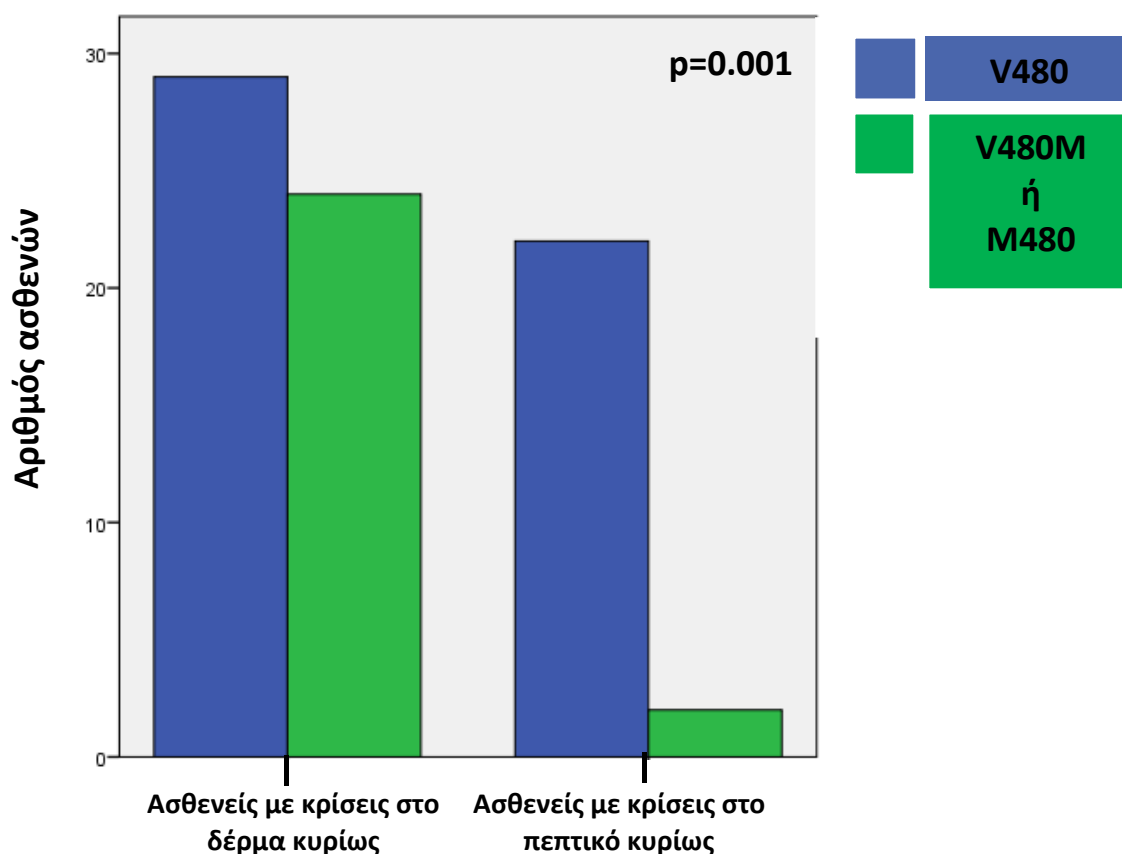
2.4.3 Κρίσεις ΚΑΟ στο πεπτικό σύστημα

Η παρουσία του πολυμορφισμού *SERPING1-V480M* σχετιζόταν σε σημαντικό βαθμό με μικρότερη συχνότητα κρίσεων ΑΟ από το πεπτικό σύστημα των ασθενών ($p=0.008$). Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 47 φαίνεται ότι οι ετερόζυγοι και ομόζυγοι με τον πολυμορφισμό στο *SERPING1-V480M* έχουν μειωμένο αριθμό κρίσεων από το πεπτικό και περισσότερες από δέρμα. Αντίθετα η συχνότητα των κρίσεων ΑΟ στα κοιλιακά σπλάχνα δε σχετιζόταν με τους πολυμορφισμούς *F12-C46T* ($p=0.07$) και *BDKRB1-* (-699G>C) ($p=0.36$) και της παρουσίας του αλληλίου *ACE-I* ($p=0.46$).



Εικόνα 47. Κρίσεις στο πεπτικό σε ασθενείς με ΚΑΟ και πολυμορφισμός *SERPING1-V480M*

Σε περαιτέρω στατιστική ανάλυση των κρίσεων ΑΟ του πεπτικού με δύο συγκρινόμενες ομάδες (ομάδα με περισσότερες κρίσεις από το πεπτικό έναντι ομάδας που κυριαρχούσαν οι κρίσεις από το δέρμα) τα αποτελέσματα παρέμειναν τα ίδια, όπως και πριν, αλλά με ακόμη σημαντικότερες στατιστικά διαφορές. Συγκεκριμένα συγκρίνοντας τις δύο αυτές φαινοτυπικές ομάδες του ΚΑΟ και την ύπαρξη ή όχι ενός τουλάχιστον αλληλίου Met480 στο γονίδιο *SERPING1*, είχαμε ακόμη ισχυρότερη στατιστική σημαντικότητα ($p=0.001$ – Εικόνα 48). Άρα στους ομόζυγους ή ετερόζυγους με τον πολυμορφισμό *SERPING1-V480M* φαίνεται να κυριαρχούν οι κρίσεις από το δέρμα.



Εικόνα 48. Κυρίως κρίσεις στο πεπτικό ή στο δέρμα σε ασθενείς με ΚΑΟ και παρουσία ή μη του πολυμορφισμού *SERPING1-V480M*

2.4.4 Μακροχρόνια θεραπεία με ανδρογόνα

Επίσης υπήρξε συσχέτιση της μακροχρόνιας θεραπείας με ανδρογόνα και του πολυμορφισμού *SERPING1-V480M* ($p=0.014$). Όπως είδαμε στην προηγούμενη παράγραφο 2.4.3 «Κρίσεις ΚΑΟ στο πεπτικό σύστημα», ο πολυμορφισμός V480M σχετιζόταν με την εντόπιση των κρίσεων ΑΟ στο δέρμα ή στο πεπτικό, και πιθανώς η εκλεκτική εντόπιση των κρίσεων αυτών να οδηγούσε στη χρήση των ανδρογόνων. Αντίθετα δεν υπήρξε συσχέτιση της θεραπείας με ανδρογόνα με τους άλλους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς (*F12-C46T*: $p=0.57$, *BDKRB1-(-699G>C)*: $p=0.74$, *ACE-I/D*: $p=0.58$).

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τις διεθνείς ομοφωνίες η συχνότητα του ΚΑΟ είναι περίπου 1:50.000 (από 1:10.000 έως 1:150.000) του γενικού πληθυσμού.^{63, 66} Σε μια πρόσφατη μελέτη στη γειτονική γεωγραφικά Ιταλία από εθνικό κέντρο ΑΟ με 983 ασθενείς αναφέρεται συχνότητα περίπου 1:65.000.³⁷³ Στην Ελλάδα με πληθυσμό περίπου 10.8 εκατομμύρια (απογραφή 2011)³⁷⁴ περιμένουμε από 165 ως 215 ασθενείς με ΚΑΟ για αντίστοιχες συχνότητες της νόσου (1:65.000 ως 1:50.000). Στην παρούσα μελέτη ο επιπολασμός του ΚΑΟ στην Ελλάδα υπολογίσθηκε περίπου σε 1:84.000. Η διαφορά παρατηρούμενης και αναμενόμενης συχνότητας του ΚΑΟ μπορεί να οφείλεται στο ότι: α) η νόσος στην Ελλάδα υποδιαγιγνώσκεται σταθερά, β) καταγράφονται τα βαρύτερα περιστατικά, γ) υπάρχουν άλλα κέντρα ή ιατροί με μικρό αριθμό ασθενών που δεν έχουν καταγραφεί, δ) η συχνότητα της νόσου στην Ελλάδα να είναι μικρότερη. Οι παραπάνω λόγοι έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες ως αιτίες αυτής της διαφοράς.³⁷³ Καθώς θα συνεχίζεται η αναζήτηση και η καταγραφή των ατόμων με ΚΑΟ στην Ελλάδα και μετά το πέρας της διατριβής, θα αιτιολογηθεί πιθανώς καλύτερα η παραπάνω διαφορά.

Η πρώτη συστηματική προσπάθεια καταγραφής του ΚΑΟ στην Ελλάδα επέτυχε να καλύψει το μεγαλύτερο μέρος της χώρας, αλλά ορισμένες περιοχές, κυρίως της βόρειας, της δυτικής και της νησιωτικής χώρας, παραμένουν ακόμη ακάλυπτες. Η διαφορά μπορεί επίσης να οφείλεται στην επικέντρωση της εκστρατείας ευαισθητοποίησης κυρίως στους αλλεργιολόγους, καθώς η μελέτη έγινε υπό την αιγίδα της Ελληνικής Αλλεργιολογικής Εταιρείας και Κλινικής Ανοσολογίας. Το γεγονός αυτό ενισχύει περαιτέρω την άποψη ότι υπάρχουν ασθενείς που παραμένουν αδιάγνωστοι ή δεν έχουν καταγραφεί.

Στη μελέτη μας διεγνώσθη ΚΑΟ τύπου I στο 88.2% και τύπου II στο 11.8% του συνόλου των οικογενειών, ποσοστά παραπλήσια με αυτά που συναντάμε στη διεθνή βιβλιογραφία (περίπου 85% και 15%, αντίστοιχα).⁶³ Επίσης στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται έναρξη του ΚΑΟ μέσα στην πρώτη δεκαετία της ζωής στο 50% των ασθενών και στο 83% μέχρι τη δεύτερη δεκαετία.⁶³ Στην παρούσα μελέτη τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν παραπλήσια με 58.4% στην πρώτη δεκαετία της ζωής και 84.4% μέχρι τη δεύτερη δεκαετία. Αυτό επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η νόσος στην Ελλάδα πρωτοεμφανίζεται συνηθέστερα κατά την παιδική ηλικία και την εφηβεία, αλλά όχι πάντοτε. Στο άλλο

ηλικιακό άκρο είναι ενδιαφέρον ότι 19% των ασθενών που καταγράφηκαν με κρίσεις ΑΟ είχαν ηλικία μεγαλύτερη των 60 ετών (μέχρι και 84). Δηλαδή **τα επεισόδια του ΚΑΟ μπορεί να συμβαίνουν και σε μεγάλη ηλικία**, αντίθετα με την παλαιότερη κρατούσα αντίληψη, σύμφωνα με την οποία η νόσος εξαφανίζεται κλινικά μετά την ηλικία των 60 ετών.

Η έναρξη του ΚΑΟ ήταν συχνότερη στο πεπτικό σε μία μελέτη,³⁷⁵ ενώ σε άλλη προεξήρχε η έναρξη στο δέρμα.³⁷⁶ Τα ευρήματά μας δείχνουν ως θέση πρώτης προσβολής το πεπτικό στους μισούς ασθενείς και το δέρμα στους υπόλοιπους, με ένα μόνο άτομο να αναφέρει έναρξη με προσβολή του λάρυγγα. Συμπερασματικά **ο λάρυγγας είναι ιδιαίτερα σπάνια θέση έναρξης του ΚΑΟ, χωρίς όμως και να αποκλείεται**. Πιθανώς πάντως να υποεκτιμάται η προσβολή του δέρματος ως θέση έναρξης των κρίσεων ΑΟ, λόγω του ότι οιδήματα στο δέρμα κατά την παιδική ηλικία μπορεί να περνούν απαρατήρητα ή να θεωρούνται φυσιολογικά λόγω των συχνών τραυματισμών των παιδιών. Επίσης λόγω της αναδρομικής φύσης της μελέτης, δεν μπορεί να αποκλεισθεί το σφάλμα ανάκλησης (*recall bias*) της πληροφορίας.

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του επιπολασμού της νόσου παίζει και η καθυστέρηση της διάγνωσης, που το 1976 έφθανε τα 21 έτη⁶⁷, αλλά έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Ενδεικτικά, στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι είναι περί τα 7 έτη,³⁷⁷ στην Ιταλία τα 10 έτη,³⁷³ στην Ισπανία τα 13.1 έτη⁵ και στη Δανία τα 16.3 έτη⁷². Κατά συνέπεια, **η καθυστέρηση της διάγνωσης του ΚΑΟ που προσδιορίστηκε στην Ελλάδα στα 17.5 έτη**, είναι μια από τις μεγαλύτερες που σημειώνονται διεθνώς με προφανείς συνέπειες για τη νοσηρότητα και τη θνητότητα των ασθενών. Στην άλλη πλευρά, ένα σημαντικό και αισιόδοξο γεγονός είναι **η αύξηση του αριθμού των διαγνώσεων ασθενών με ΚΑΟ την τελευταία δεκαετία στη χώρα**, ενδεικτικό της ευαισθητοποίησης για την πάθηση.

Η μεγαλύτερη συχνότητα των κρίσεων ΑΟ σε λάρυγγα και πεπτικό στους Έλληνες ασθενείς συνάδει με τη καταγραφή βαρύτερων νοσοκομειακών περιστατικών. Επίσης υπάρχουν και υποομάδες ασθενών με κρίσεις μόνο από το δέρμα ή μόνο από το πεπτικό. Όσον αφορά τις επιπλοκές, δυστυχώς το 23.5% και το 16.7% είχαν υποστεί αναίτια χειρουργική επέμβαση και τραχειοτομία-διασωλήνωση αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό

υποδεικνύει ότι οι ασθενείς θα πρέπει να έχουν και να χρησιμοποιούν τα φάρμακα της οξείας κρίσης του ΚΑΟ και επίσης ότι υπάρχει ανάγκη ενημέρωσης των ιατρών. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται εσφαλμένο χειρουργείο οξείας κοιλίας σε παραπλήσιο ποσοστό γύρω στο 30% των ασθενών.⁶⁶

Θάνατοι είχαν συμβεί κυρίως σε μη διαγνωσμένα συμπτωματικά άτομα και σπάνια σε ήδη διαγνωσμένα. Σε παρόμοιο συμπέρασμα καταλήγει και μελέτη από τη Γερμανία.³⁷⁸ Πιθανώς οι θάνατοι αυτοί αποτελούν υποεκτίμηση διότι: α) σε κάποια θανόντα άτομα οικογένειας πασχόντων δεν υπήρχε διάγνωση ΚΑΟ, ή β) σε άλλα άτομα δεν έγιναν γνωστά τα αίτια του αιφνίδιου θανάτου. Τα ευρήματα αυτά θέτουν επιτακτική την ανάγκη της έγκαιρης διάγνωσης του ΚΑΟ και του διεξοδικού ελέγχου των οικογενειών ασθενών με ΚΑΟ με βάση τη γνώση της επικρατούσας σωματικής κληρονομικότητας της μετάλλαξης στο ΚΑΟ, με σχεδόν 100% διεισδυτικότητα. Ακόμη περισσότερο, το δευτερογενές εύρημα της μελέτης ότι 8 φαινομενικώς υγιή παιδιά από οικογένειες ασθενών είχαν ορολογικά και γενετικά ευρήματα ΚΑΟ, χωρίς να έχουν ακόμη εμφανίσει τη νόσο, θέτει εκ νέου το θέμα του μαζικού ελέγχου των ασυμπτωματικών μελών των οικογενειών των πασχόντων, για το οποίο ακόμη στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει ομοφωνία.³⁷⁹

Οι μισοί ασθενείς της μελέτης είχαν κρίσεις ΑΟ τουλάχιστον κάθε μήνα από το πεπτικό ή το δέρμα και ετησίως από το λάρυγγα, όταν δε λάμβαναν προληπτική αγωγή με ανδρογόνα. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν το μέγεθος του προβλήματος, τόσο για τους ίδιους τους ασθενείς, όσο και για το σύστημα υγείας. Στους ασθενείς της μελέτης η συχνότητα των κρίσεων ΑΟ δε φάνηκε να σχετίζεται με τη συγκέντρωση του C4, ούτε με το μέγεθος της ενζυμικής ανεπάρκειας του C1-INH στο αίμα όπως υποστηρίζεται και από μία ακόμη μελέτη,⁷⁹ ενώ αντίθετα υπάρχει άλλη μελέτη που αναφέρει θετική συσχέτιση.⁸⁰

Αξιοσημείωτο, επίσης, εύρημα της μελέτης είναι η **ανάδειξη των ιογενών λοιμώξεων ως προκλητικών παραγόντων των επεισοδίων ΚΑΟ**, πέραν των γνωστών ψυχικού στρες ή τραυματισμού. Σχετικές αναφορές δεν υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία, όπου γενικότερα το θέμα των εκλυτικών παραγόντων δε φαίνεται να έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Στις γυναίκες ασθενείς το 29.6% ανέφερε σχέση των κρίσεων ΑΟ και

έμμηνου ρύσης, κυρίως περιεμμηνορυσιακή επιδείνωση έναντι 42.5% της βιβλιογραφίας.^{81, 380} Τα **αντισυλληπτικά** επίσης επιδείνωσαν τη νόσο στο 40% των γυναικών έναντι 63% της διεθνούς βιβλιογραφίας.^{381, 382} Το ΚΑΟ ήταν βελτιωμένο στο 75.8% των κυήσεων των γυναικών της μελέτης και επιδεινούμενο στο 24.2%. Τα ποσοστά ήταν καλύτερα από τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας (30% και 38%), ένα εύρημα που σε αυτή την φάση δεν μπορεί να εξηγηθεί.³⁸⁰ Αυτή η ποικίλη σχέση των εκλυτικών παραγόντων και των κρίσεων του ΚΑΟ τονίζει ότι η φαινοτυπική εκδήλωση της νόσου εξαρτάται και από άλλους άγνωστους παράγοντες, περιβαλλοντικούς ή/και γενετικούς.

Ως προς τα φάρμακα για την αντιμετώπιση της οξείας κρίσης ΚΑΟ στην Ελλάδα, περίπου το 10% των ασθενών δήλωσαν ότι δεν τα είχαν και έτσι ήταν απροστάτευτοι τη στιγμή της καταγραφής. Συμπερασματικά παρά την ύπαρξη αποτελεσματικών θεραπειών και εξαιρετικά καλά ανεκτών θεραπειών, ακόμη και στον χρόνο της καταγραφής, υπήρχαν στην Ελλάδα **ασθενείς που παρέμεναν απροστάτευτοι σε σοβαρή κρίση**. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις σαφείς διεθνείς κατευθυντήριες θεραπευτικές οδηγίες, όπου κάθε ασθενής θα πρέπει να φέρει τα φάρμακα αυτά μαζί του.⁸²

Αισιόδοξο ήταν το γεγονός ότι σχεδόν όλοι οι ασθενείς ήταν θετικοί στην αυτοχορήγηση των φαρμάκων αυτών, γιατί τους έδινε μεγαλύτερο έλεγχο της νόσου και πρόσφερε μικρότερη ταλαιπωρία. Ένα υψηλό ποσοστό (72.9%) είχε εκπαιδευθεί στην αυτοχορήγηση της υποδόριας ικατιμπάντης, αλλά όχι όλοι. Η εκπαίδευση των ασθενών στην αυτοχορήγηση των φαρμάκων έχει δείχθει ότι μειώνει σημαντικά το έμμεσο κόστος της νόσου. Εκτός από την ελάττωση του νοσοκομειακού κόστους, λόγω μη προσέλευσης των ασθενών στα Τμήματα Επειγόντων Περιστατικών για την αντιμετώπιση των κρίσεων, φαίνεται ότι συνεπάγεται ακόμη και αποδέσμευση πολλών ασθενών από την προφυλακτική θεραπεία.³⁸³ Δεδομένου ότι σήμερα είναι πλέον αποδεκτό ότι όλοι οι ασθενείς με ΚΑΟ μπορεί να ωφεληθούν από την αυτοχορήγηση,^{384, 385} το ποσοστό των Ελλήνων ασθενών που έχουν αυτή τη δυνατότητα θα μπορούσε να βελτιωθεί. Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι **θεραπευτικά η κατάσταση υπολείπεται σημαντικά των αναγκών που υπάρχουν**.

Οι μισοί ασθενείς της μελέτης είχαν λάβει προφυλακτικά ανδρογόνα μακροχρονίως, άνω των 6 μηνών. Οι συχνές κρίσεις από το πεπτικό οδηγούσαν στη

μακροχρόνια χορήγηση ανδρογόνων και όχι οι κρίσεις από τον λάρυγγα. Το φύλο πιθανώς έπαιζε ρόλο στην επιλογή της θεραπείας με ανδρογόνα. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες όμως των ανδρογόνων ήταν αρκετά συχνές, ιδιαίτερα στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τη ζωή των ασθενών ή να τους έχουν αναγκάσει να διακόψουν ή να μειώσουν τη δόση χορήγησης. Η εικόνα αυτή είναι παρόμοια με τη διεθνή βιβλιογραφία και αποτελεί μια ανεκπλήρωτη θεραπευτική ανάγκη για το ΚΑΟ **η χρήση ενός φαρμάκου για την πρόληψη των κρίσεων ΑΟ με σαφώς λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες.**

Η πρώτη και η συχνότερη επαφή των ασθενών με ΚΑΟ γίνεται με γιατρούς άλλων ειδικοτήτων εκτός Αλλεργιολόγων, συνήθως σε Τμήματα Επειγόντων Περιστατικών, οι οποίοι δε διαθέτουν την απαραίτητη επάρκεια για την αναγνώριση της νόσου. Αυτό φαίνεται εμμέσως από το γεγονός ότι 37.3% των καταγεγραμμένων ασθενών δήλωσαν ότι είχαν αντιμετωπίσει άρνηση των γιατρών να τους χορηγήσουν τα ενδεδειγμένα φάρμακα που είχαν μαζί τους για την αντιμετώπιση των κρίσεων, λόγω δηλουμένης άγνοιας της νόσου ή και των φαρμάκων. Η περαιτέρω, κατά συνέπεια, προσπάθεια αποκάλυψης και καταγραφής των ασθενών ΚΑΟ που υπάρχουν στη χώρα μας, πρέπει να εστιαστεί **στην ενημέρωση των γιατρών όλων των ειδικοτήτων που δυνητικά εμπλέκονται στη διάγνωση της πάθησης.**

Στην μελέτη μας φάνηκε ότι **το ΚΑΟ είναι ένα νόσημα που επηρεάζει σαφέστατα και πολυπλεύρως διάφορες πτυχές της ζωής των Ελλήνων ασθενών** και το σύνολο των επεισοδίων του ΚΑΟ πιθανώς αποτελεί ένα μέτρο εκτίμησης της επίδρασης αυτής. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε ομοφωνία με άλλες Ευρωπαϊκές μελέτες. Έτσι σε μελέτη 103 ασθενών με ΚΑΟ στην Σουηδία (ενηλίκων και παιδιών) φάνηκε η σημαντική επίδραση του ΚΑΟ στην ποιότητα ζωής. Η συχνότητα των κρίσεων έπαιζε σημαντικό ρόλο και συγκεκριμένα οι ασθενείς με >30 κρίσεις είχαν σαφέστατα χειρότερη ποιότητα ζωής από αυτούς με λιγότερες κρίσεις. Οι κρίσεις οδηγούσαν σε απουσία από την εργασία ή το σχολείο (44.6%).³⁸⁶ Σε 193 Γάλλους ασθενείς η ποιότητα της ζωής ήταν σαφώς επηρεασμένη, όταν υπήρχαν >5 κρίσεις ΚΑΟ ανά έτος.³⁸⁷ Πρόσφατα οι Caballero et al. βρήκαν ότι η συχνότητα και η βαρύτητα των κρίσεων ήταν σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες του σχετιζόμενου άγχους με το ΚΑΟ.⁷⁰ Παραπλήσια ευρήματα υπήρξαν και

σε πολυκεντρική Ευρωπαϊκή μελέτη 186 ατόμων, αλλά και σε ασθενείς στη Βραζιλία.^{70, 388} Σε μια μικρή μελέτη 27 ατόμων από τη Δανία δε φάνηκε η ποιότητα ζωής να επηρεάζεται από την νόσο συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό.³⁸⁹ Κάθε επεισόδιο ΚΑΟ εκτιμάται ότι συνεπάγεται απώλεια 3.3 εργάσιμων ημερών (εύρος 0.5-180) και μέσο ετήσιο κόστος 42.000 δολάρια ανά ασθενή στις ΗΠΑ.⁷⁴ Γενικότερα, η επίδραση της νόσου στην παραγωγικότητα των ασθενών υπολογίζεται ότι είναι η ίδια με εκείνη που έχει το βαρύ βρογχικό άσθμα και λίγο μικρότερη από αυτή της νόσου του Crohn⁷³. Η εφαρμογή ενός ειδικού ερωτηματολογίου για την ποιότητα της ζωής των ασθενών με ΚΑΟ, το οποίο και ετοιμάζεται, θα ρίξει ακόμη περισσότερο φως στον τομέα αυτό και θα μας οδηγήσει να δούμε το ΚΑΟ υπό ένα νέο πρίσμα.³⁹⁰

Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι το **ΚΑΟ είναι σπάνια μεν πάθηση, αλλά με σύνθετο χαρακτήρα** και πολλές παραμέτρους (ιατρική, ψυχολογική, κοινωνική) και χρήζει πολύπλευρης αντιμετώπισης. **Συμπερασματικά από πλευράς κλινικής εικόνας, το ΚΑΟ στην Ελλάδα δε φαίνεται να παρουσιάζει σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τις περιγραφές του φαινοτύπου στη διεθνή βιβλιογραφία.**⁷¹ Όμως τα προηγούμενα θεραπευτικά δεδομένα και οι απαντήσεις των Ελλήνων ασθενών για τα προβλήματά τους σε διάφορες πτυχές της ζωής, υποδεικνύει **ότι η αντιμετώπιση του ΚΑΟ στη χώρα μας υπολείπεται ακόμη** και δεν φαίνεται να ακολουθεί τις σχετικές διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες και θέσεις ομοφωνίας.^{391, 392}

Όσον αφορά τη μελέτη των πολυμορφισμών των γονιδίων δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα του αλληλίου μεταξύ των ασθενών με ΚΑΟ και υγιών μαρτύρων, με μόνη εξαίρεση τον πολυμορφισμό *F12-C46T*. Αυτή η διαφορά ίσως να οφείλεται στην οριακή ανισορροπία σύνδεσης Hardy-Weinberg του πληθυσμού των μαρτύρων ($p=0.06$).

Όπως αναφέρθηκε, ο πολυμορφισμός *SERPING1-V480M* δε φαίνεται να επηρεάζει τη δομή, τη σταθερότητα, ή τη συγκέντρωση του C1-INH, καθώς και την αναστολή του C1.³⁵⁸ Αυτό όμως δεν μπορεί να αποκλείσει το ενδεχόμενο ο πολυμορφισμός να επηρεάζει άλλες λειτουργίες του C1-INH ως ρυθμιστή του συστήματος κινινών-καλλικρεΐνης και του συστήματος πήξης.^{358, 393} Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι οι ομόζυγοι ή ετερόζυγοι στον ως άνω πολυμορφισμό είχαν περισσότερες

κρίσεις στο δέρμα και αποτελεί **την πρώτη περιγραφόμενη γενετική συσχέτιση με την θέση εκδήλωσης του ΚΑΟ.**

Έχοντας υπόψιν την επιδείνωση του ΚΑΟ με τη χορήγηση ACEi, την νοσολογική οντότητα του AE-ACEi, το κεντρικό ρόλο του ACE στην αποδόμηση της BK και τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του ACE σε παρουσία του αλληλομόρφου I και άρα υψηλότερα BK, θα περίμενε κάποιος ο πολυμορφισμός αυτός να παίζει σημαντικό ρόλο στο ΚΑΟ. Η παραπάνω υπόθεση δεν επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη, όπως και σε προηγούμενη.³⁶⁵ Έτσι **ο πολυμορφισμός I του ACE δε φάνηκε να επηρεάζει κάποιο από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου** και το εύρημα αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από την μεγαλύτερη σημασία των μορίων ενεργοποίησης του συστήματος επαφής (π.χ. FXII, KL), καθώς και την επάρκεια άλλων εναλλακτικών οδών αποδόμησης της BK στο ΚΑΟ.

Η παρουσία του πολυμορφισμού -699G>C του *BDKRB1* σχετιζόταν με καθυστερημένη έναρξη και άρα ηπιότερη κλινική νόσο στο ΚΑΟ. Είναι γνωστό ότι ο B1R υποδοχέας εκφράζεται σε καταστάσεις stress και τέτοιες καταστάσεις αποτελούν εκλυτικά αίτια των κρίσεων ΚΑΟ. Σε προηγούμενη μελέτη από τους Freiburger et al. δεν υπήρξε συσχέτιση με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου σε 80 ασθενείς.³⁶⁵ Πιθανώς άλλη μεγαλύτερη μελέτη θα μπορέσει να επιβεβαιώσει ή όχι την παραπάνω διαφορά.

Ο πολυμορφισμός του *F12-C46T* είναι ένας αρχαίος πολυμορφισμός, εμφανίζεται συχνά εδώ και 5.000 γενιές στο ανθρώπινο είδος, σε όλες τις ηπείρους.¹⁹⁰ Το πιο σημαντικό και νέο εύρημα της μελέτης μας είναι **η συσχέτιση του T αλληλομόρφου στον *F12* με την καθυστέρηση της έναρξης του ΚΑΟ.** Αυτό επιβεβαιώνεται πλέον σαφώς σε πολύ πρόσφατη πολυκεντρική πανευρωπαϊκή μελέτη σε 258 ασθενείς με ΚΑΟ, η οποία αποτέλεσε προέκταση της μελέτης μας, όπου ο *F12-C46T* σχετιζόταν σημαντικά με καθυστέρηση της έναρξης του ΚΑΟ κατά 7 έτη ($p=0.0001$).³⁹⁴

Όπως είδαμε, η παρουσία του T αλληλομόρφου στο *F12* οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα του FXII με συνέπεια την μειωμένη ενεργοποίηση του συστήματος επαφής και της παραγωγής BK. Αυτό με τη σειρά του είχε πιθανώς ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης της νόσου και τη συσχέτιση με ηπιότερη κλινική πορεία. Ο FXII κινητοποιεί

το σύστημα κινινών-καλλικρεΐνης με αποτέλεσμα την παραγωγή BK, δηλαδή **ενεργοποιείται κατά την έναρξη μιας κρίσης ΚΑΟ**. Ο κεντρικός ρόλος του FXII στην έναρξη των κρίσεων ενισχύεται επίσης από το γεγονός ότι *in vitro* ο FXII μπορεί να ενεργοποιηθεί από φωσφολιπίδια. Τα τελευταία παράγονται κατά την κυτταρική απόπτωση, η οποία είναι αυξημένη σε καταστάσεις stress και τραύματος. Ασθενείς με ΚΑΟ ήταν ασυμπτωματικοί, όταν είχαν αντισώματα έναντι φωσφολιπιδίων.³⁹⁵ Η αυξημένη λειτουργία του FXII είναι γνωστό ότι ευθύνεται για το ΚΑΟ χωρίς ανεπάρκεια του C1-INH, λόγω μεταλλάξεων του *F12*¹¹⁵ και σε πρόσφατη μελέτη ερμηνεύθηκε ο παθογενετικός τους μηχανισμός. Συγκεκριμένα υπάρχει μετα-μεταφραστική ελλειμματική γλυκοζυλίωση του παράγοντα FXII λόγω μετάλλαξης στη θέση 309 και αντικατάστασης της θρεονίνης, με συνέπεια την ευκολότερη ενεργοποίηση του συστήματος επαφής.³⁹⁶ Ακόμη περισσότερο είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα και η IL-6, η οποία και αυξάνεται σε λοιμώξεις και τραύμα, αυξάνουν την μετάφραση του *F12*.¹⁵⁶ Και αυτοί οι παράγοντες είναι εκλυτικά αίτια των κρίσεων ΚΑΟ, όπως φάνηκε και στην μελέτη μας.

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει και ενισχύει τον κεντρικό και σημαντικό ρόλο του παράγοντα FXII στην παθοφυσιολογία του ΚΑΟ και αποτελεί την πρώτη μελέτη, η οποία συσχετίζει σε τόσο ισχυρό βαθμό και σε τόσο μεγάλο πληθυσμό την ύπαρξη ενός γενετικού πολυμορφισμού με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ΚΑΟ, και συγκεκριμένα άμεσα με την ηλικία εμφάνισης της πρώτης κρίσης ΑΟ και έμμεσα με τη βαρύτητα της νόσου. Τα ευρήματά μας δείχνουν ότι μια γενετικά αλλαγή σε γονίδιο, πέρα από το *SEPRING1*, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, εκτός του C1-INH, εμπλέκεται στην παθογένεια ΚΑΟ και μπορεί να επηρεάσει τον φαινότυπό του.

Συμπερασματικά **ο πολυμορφισμός *F12-C46T* αποτελεί τον μοναδικό, μέχρι στιγμής, γενετικό παράγοντα με τόσο ισχυρή επίδραση στον φαινότυπο του ΚΑΟ και μια απάντηση σε ένα από τα παλαιότερα άλυτα προβλήματα της ετερογενούς κλινικής εκδήλωσης του ΚΑΟ**. Μελλοντικά μπορεί να αποτελέσει έναν προγνωστικό δείκτη της σοβαρότητας του ΚΑΟ στην αναζήτηση ενός εξατομικευμένου φαινοτύπου και κατ' επέκτασης θεραπείας. Επίσης με βάση την κεντρική θέση του FXII στη έναρξη των κρίσεων και εν γένει στην παθοφυσιολογία της νόσου, ίσως ο FXII αποτελέσει ένα

θεραπευτικό στόχο στο ΚΑΟ με την χορήγηση ειδικών αναστολέων, που έχουν πρόσφατα παραχθεί. Ήδη ερευνητικά δοκιμάζονται ειδικοί αναστολείς του FXII ώστε να μειώσουν την θρομβογόνο ικανότητα του FXII, χωρίς να αυξάνουν τον κίνδυνο αιμορραγίας, όπως υφίσταται ο κίνδυνος αυτός από τις υφιστάμενες θεραπείες αντιπηκτικής αγωγής.^{397, 398}

ΣΚΟΠΟΣ Η παρουσίαση των πρώτων αποτελεσμάτων της πανελλήνιας καταγραφής ασθενών με κληρονομικό αγγειοίδημα (ΚΑΟ) κατά την τελευταία τετραετία (Ιούλιος 2010 – Ιούνιος 2014) και η αναζήτηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών γονιδίων, τα οποία παράγουν πρωτεΐνες της οδού του συστήματος κινινών- καλλικρεΐνης, με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ΚΑΟ.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ Έγινε πανελλήνια συστηματική καταγραφή των περιπτώσεων ΚΑΟ μέσω ευρείας συνεργασίας με ιατρούς και νοσοκομεία σε όλη τη χώρα. Σε όσους ασθενείς συμμετείχαν στην μελέτη συμπληρώθηκε: α) τυποποιημένο ερωτηματολόγιο για την καταγραφή δημογραφικών - κλινικών και θεραπευτικών χαρακτηριστικών της νόσου και β) γενεαλογικό δέντρο σε κάθε οικογένεια. Σε κάθε συμμετέχοντα ασθενή έγινε λήψη περιφερικού αίματος για τον προσδιορισμό των πολυμορφισμών *F12*-5046T>C (rs1801020), *BDKRB1*-(-699G>C) (rs4905475), *SERPING1*-21963G>A (p.V480M, rs4926) και *ACE* I/D (rs1799752). Η ανίχνευση των πολυμορφισμών έγινε με την τεχνική PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), δηλ. μέσω ενίσχυσης τμημάτων DNA με PCR και εν συνεχεία πέψης με ένζυμα περιορισμού για τους τρεις πρώτους και με απλή PCR για τον τελευταίο. Σε ορισμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από υγιείς δότες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Καταγράφηκαν 128 ασθενείς με ΚΑΟ τύπου I και II που ανήκουν σε 42 μη συγγενείς οικογένειες (επιπολασμός της νόσου στην Ελλάδα 1:84.000). Επιπρόσθετα καταγράφηκε και μια οικογένεια με 3 μέλη με ΚΑΟ με φυσιολογικό C1-INH. Σε 85 από τους ως άνω ασθενείς, από 34 οικογένειες, έγινε γενετική ανάλυση. Η μέση καθυστέρηση της διάγνωσης της νόσου ήταν τα 17.5 έτη (εύρος 0-58 έτη) , αλλά η διάγνωση ασθενών με ΚΑΟ έχει σαφώς αυξηθεί την τελευταία δεκαετία. 16.7% των ασθενών είχαν υποβληθεί σε διασωλήνωση της τραχείας ή τραχειοτομή λόγω οιδήματος λάρυγγα και 23.5% είχαν υποβληθεί σε άσκοπες χειρουργικές επεμβάσεις λόγω κρίσεων αγγειοιδήματος στο πεπτικό. Η συχνότητα των θανάτων λόγω ΚΑΟ ήταν περίπου 1 ανά

3 οικογένειες και αφορούσε στην πλειοψηφία τους μη διαγνωσμένους ασθενείς. Το 10.4% των ασθενών δήλωσαν ότι δεν είχε οποιοδήποτε φάρμακο για την αντιμετώπιση των επεισοδίων ΑΟ και 84.7% ανέφεραν ότι η ζωή τους ήταν επηρεασμένη από μέτρια ως σοβαρά λόγω της νόσου. Η παρουσία του πολυμορφισμού *F12-5046T>C* και του *BDKRB1-(-699G>C)* καθυστερούσε την έναρξη του ΚΑΟ κατά 4.6 έτη ($p=0.03$) και κατά 9.4 έτη ($p=0.02$) αντίστοιχα. Στους ομόζυγους ή ετερόζυγους με πολυμορφισμό V480M στο *SERPING1* κυριαρχούσαν οι κρίσεις από το δέρμα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Η παρούσα διατριβή, η οποία αποτέλεσε την πρώτη προσπάθεια πανελλαδικής καταγραφής ασθενών με ΚΑΟ, κατάφερε να καλύψει το μεγαλύτερο τμήμα της χώρας. Στην Ελλάδα υπήρχε σημαντική καθυστέρηση της διάγνωσης του ΚΑΟ, από τις μεγαλύτερες παγκοσμίως, η οποία την τελευταία δεκαετία φαίνεται να αναστρέφεται θεαματικά. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την θεραπευτική αντιμετώπιση, η οποία σαφώς υπολείπεται της διεθνούς πραγματικότητας, έχουν δυσμενείς συνέπειες για τους ασθενείς. Έτσι αναδεικνύεται η ανάγκη για την προώθηση πρακτικών αντιμετώπισης του προβλήματος. Τα υπόλοιπα επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά του ΚΑΟ στη χώρα μας δε διαφέρουν από τα αναφερόμενα διεθνώς. Οι πολυμορφισμοί *F12-5046T>C* και του *BDKRB1-(-699G>C)* σχετίζονται σημαντικά με καθυστερημένη έναρξη της νόσου και άρα ηπιότερη νόσηση από ΚΑΟ, ενώ ο *SERPING1-21963G>A* με εντόπιση κρίσεων αγγειοιδήματος στο δέρμα. Σε πολύ πρόσφατη πολυκεντρική Ευρωπαϊκή μελέτη, προέκταση της παρούσας μελέτης, επιβεβαιώθηκε ότι ο πολυμορφισμός *F12-5046T>C* αποτελεί τον μοναδικό, μέχρι στιγμής, ανεξάρτητο γενετικό παράγοντα με τόσο ισχυρή επίδραση στον φαινότυπο και την πρόγνωση της νόσου.

Λέξεις ευρητηρίου: αναστολέας της C1-εστεράσης, κληρονομικό αγγειοίδημα, πολυμορφισμός, σύστημα επαφής, σύστημα κίνησης-καλλικρεΐνης, Ελλάδα, *F12-46C/T*

ABSTRACT

OBJECTIVE: To present the initial results from the patients with hereditary angioedema (HAE) recorded over the last four years throughout Greece (July 2010 – June 2014) and to search the correlation of polymorphisms of genes, which produce proteins of kinin – kallikrein system, with phenotypic characteristics of HAE.

METHODS: A systematic recording of hereditary angioedema (HAE) cases was undertaken through broad collaboration with doctors and hospitals across the country. Patients, who participated in the study, filled: a) a standard questionnaire to record demographic - clinical - therapeutic characteristics of the disease, and b) a pedigree per family. Peripheral blood was collected from each participating patient for the determination of polymorphisms *F12*-5046T>C (rs1801020), *BDKRB1*-(-699G>C) (rs4905475), *SERPING1*-21963G>A (p.V480M, rs4926) and *ACE* I/D (rs1799752). The first three polymorphisms were detected by PCR-RFLP method (restriction fragment length polymorphism), specifically DNA fragments were amplified using PCR and then digested through the respective restriction enzymes, except of *ACE* I/D polymorphism where only PCR was used. For some samples the results were confirmed by direct sequencing using standard molecular protocols. Peripheral blood samples from healthy donors were used as controls.

RESULTS: 128 patients from 42 non-related families were recorded and the prevalence of HAE in Greece is estimated at approximately 1:84.000. Additionally an HAE family with normal C1-INH was recorded having 3 members. Genetic analysis was carried out to 85 patients from 34 families. The average delay of the diagnosis was 17.5 years (range 0-58 years), but the diagnosis of patients with HAE has clearly improved over the last decade. 16.7% of patients had undergone intubation or tracheotomy because of laryngeal attack, while 23.5% had undergone unnecessary surgery due to abdominal attack. The frequency of deaths due to HAE was about 1 patient every 3 families and the majority concerned non-diagnosed patients. 10.4% of patients reported that they had no medicine for the treatment of acute HAE attacks and in 84.7% patients' lives were moderate to severe affected due to disease. The presence of the polymorphism *F12*-5046T>C and *BDKRB1*-(-

699G>C) were significantly associated with the delay of onset of HAE by 4.6 years ($p = 0.03$) and 9.4 years ($p = 0.02$) respectively. In the presence of homozygous or heterozygous state of polymorphism *SERPING1*-V480M HAE attacks dominated the skin.

CONCLUSIONS: This study, which was the first nationwide registry of patients with HAE, managed to cover a large part of the country and continues. In Greece there was a significant degree of under diagnosis of HAE, which seems to have been reversed dramatically over the last decade. This fact together with the disease-specific treatment, which clearly falls short of the international guidelines, have adverse consequences for patients. This highlights the need to promote practices to tackle the problem. The remaining epidemiological and clinical characteristics of HAE in our country are no different from those reported worldwide. Polymorphisms of *F12*-5046T>C and *BDKRB1*-(-699G>C) are significantly associated with delayed onset of HAE and therefore milder disease. *SERPING1*-21963G>A polymorphism is also associated with localization of HAE attacks in the skin. A very recent multi-center European study, an extension of this study, confirmed our result that the polymorphism *F12*-5046T>C is the only, so far, independent genetic factor with such a powerful effect on phenotype and prognosis of HAE.

Key words: C1 esterase inhibitor, disease-specific quality of life, Greek Hereditary Angioedema Registry, hereditary angioedema, polymorphism, contact system, kinin-kallikrein system, *F12*-46C/T

- [1] **Cicardi M, Aberer W, Banerji A, Bas M, Bernstein JA, Bork K, et al.** "Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group". *Allergy*. 2014; 69: 602-16.
- [2] **Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Kreuz W, Zingale L, et al.** "Canadian 2003 International Consensus Algorithm For the Diagnosis, Therapy, and Management of Hereditary Angioedema". *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114: 629-37.
- [3] **Lunn ML, Santos CB and Craig TJ.** "Is there a need for clinical guidelines in the United States for the diagnosis of hereditary angioedema and the screening of family members of affected patients?". *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010; 104: 211-4.
- [4] **Lumry WR.** "Overview of epidemiology, pathophysiology, and disease progression in hereditary angioedema". *Am J Manag Care*. 2013; 19: s103-10.
- [5] **Roche O, Blanch A, Caballero T, Sastre N, Callejo D and Lopez-Trascasa M.** "Hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency: patient registry and approach to the prevalence in Spain". *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005; 94: 498-503.
- [6] **Papadopoulou-Alataki E, Foerster T, Antari V, Pavlitou-Tsiontsi A and Varlamis G.** "Molecular diagnosis and management of hereditary angioedema in a Greek family". *Int Arch Allergy Immunol*. 2008; 147: 166-70.
- [7] **Speletas M, Boukas K, Papadopoulou-Alataki E, Tsitsami E and Germenis AE.** "Hereditary angioedema in Greek families caused by novel and recurrent mutations". *Hum Immunol*. 2009; 70: 925-9.
- [8] **Γ.Χ. ΚΑΛΤΣΑΣ ΓΧΤ, Α.Κ. ΜΠΙΤΣΑΚΤΣΗΣ.** "ΣΥΓΓΕΝΕΣ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ: ΜΙΑ ΣΠΑΝΙΑ ΜΟΡΦΗ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑΤΟΣ". *ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΙΣ ΕΝΟΠΛΩΝ ΔΥΝΑΜΕΩΝ*. 1990; 24: 313-5.
- [9] **Θ. Παπαδάς ΠΓ, Α. Καρανά, Π. Γκούμας.** "Κληρονομικό αγγειοοίδημα τύπου II. Ερευνα και αναφορά σε δύο περιστατικά της ίδιας οικογένειας.". *Ιατρική* 1996; 70: 163-7.
- [10] **Lopez-Lera A, Favier B, de la Cruz RM, Garrido S, Drouet C and Lopez-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.
- [11] **Blanch A, Roche O, Urrutia I, Gamboa P, Fontan G and Lopez-Trascasa M.** "First case of homozygous C1 inhibitor deficiency". *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118: 1330-5.
- [12] **Bafunno V, Divella C, Sessa F, Tiscia GL, Castellano G, Gesualdo L, et al.** "De novo homozygous mutation of the C1 inhibitor gene in a patient with hereditary angioedema". *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132: 748-50.e3.
- [13] **Theriault A, Whaley K, McPhaden AR, Boyd E and Connor JM.** "Regional assignment of the human C1-inhibitor gene to 11q11-q13.1". *Hum Genet*. 1990; 84: 477-9.
- [14] **Janson M, Larsson C, Werelius B, Jones C, Glaser T, Nakamura Y, et al.** "Detailed physical map of human chromosomal region 11q12-13 shows high meiotic recombination rate around the MEN1 locus". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 10609-13.
- [15] **Carter PE, Duponchel C, Tosi M and 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.
- [16] **Cordaux R and Batzer MA.** "The impact of retrotransposons on human genome evolution". *Nat Rev Genet*. 2009; 10: 691-703.
- [17] **Pappalardo E, Cicardi M, Duponchel C, Carugati A, Choquet S, Agostoni A, et al.** "Frequent de novo mutations and exon deletions in the C1inhibitor gene of patients with angioedema". *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106: 1147-54.
- [18] **Kalmar L, Hegedus T, Farkas H, Nagy M and Tordai A.** "HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene". *Hum Mutat*. 2005; 25: 1-5.

- [19] **Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, et al.** "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature". *J Biol Chem.* 2001; 276: 33293-6.
- [20] **Cugno M, Zanichelli A, Foieni F, Caccia S and Cicardi M.** "C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress". *Trends Mol Med.* 2009; 15: 69-78.
- [21] **Patston PA, Gettins P, Beechem J and Schapira M.** "Mechanism of serpin action: evidence that C1 inhibitor functions as a suicide substrate". *Biochemistry.* 1991; 30: 8876-82.
- [22] **Gettins PG.** "Serpins: structure, mechanism, and function". *Chem Rev.* 2002; 102: 4751-804.
- [23] **Sim RB, Reboul A, Arlaud GJ, Villiers CL and Colomb MG.** "Interaction of 125I-labelled complement subcomponents C-1r and C-1s with protease inhibitors in plasma". *FEBS Lett.* 1979; 97: 111-5.
- [24] **Ziccardi RJ.** "Activation of the early components of the classical complement pathway under physiologic conditions". *J Immunol.* 1981; 126: 1769-73.
- [25] **Bossi F, Bulla R and Tedesco F.** "Endothelial cells are a target of both complement and kinin system". *Int Immunopharmacol.* 2008; 8: 143-7.
- [26] **Kerr FK, Thomas AR, Wijeyewickrema LC, Whisstock JC, Boyd SE, Kaiserman D, et al.** "Elucidation of the substrate specificity of the MASP-2 protease of the lectin complement pathway and identification of the enzyme as a major physiological target of the serpin, C1-inhibitor". *Mol Immunol.* 2008; 45: 670-7.
- [27] **Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Vorup-Jensen T, Koch C and Jensenius JC.** "Control of the classical and the MBL pathway of complement activation". *Mol Immunol.* 2000; 37: 803-11.
- [28] **Pixley RA, Schapira M and Colman RW.** "The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors". *J Biol Chem.* 1985; 260: 1723-9.
- [29] **Schapira M, Scott CF and Colman RW.** "Protection of human plasma kallikrein from inactivation by C1 inhibitor and other protease inhibitors. The role of high molecular weight kininogen". *Biochemistry.* 1981; 20: 2738-43.
- [30] **Verresen L, Waer M, Vanrenterghem Y and Michiels P.** "Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and anaphylactoid reactions to high-flux membrane dialysis". *Lancet.* 1990; 336: 1360-2.
- [31] **Cyr M, Eastlund T, Blais C, Jr., Rouleau JL and Adam A.** "Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions". *Transfusion (Paris).* 2001; 41: 136-50.
- [32] **Cugno M, Cicardi M and Agostoni A.** "Activation of the contact system and fibrinolysis in autoimmune acquired angioedema: a rationale for prophylactic use of tranexamic acid". *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 93: 870-6.
- [33] **Ziccardi RJ.** "A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement". *J Immunol.* 1982; 128: 2505-8.
- [34] **Nielsen EW, Johansen HT, Hogasen K, Wuillemin W, Hack CE and Mollnes TE.** "Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic and kallikrein-kinin systems during attacks of hereditary angioedema". *Scand J Immunol.* 1996; 44: 185-92.
- [35] **Milgrom H, Curd JG, Kaplan RA, Muller-Eberhard HJ and Vaughan JH.** "Activation of the fourth component of complement (C4): assessment by rocket immunoelectrophoresis and correlation with the metabolism of C4". *J Immunol.* 1980; 124: 2780-5.
- [36] **Zuraw BL.** "Clinical practice. Hereditary angioedema". *N Engl J Med.* 2008; 359: 1027-36.
- [37] **Renne T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, et al.** "Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII". *J Exp Med.* 2005; 202: 271-81.
- [38] **van Zonneveld AJ, Veerman H and Pannekoek H.** "On the interaction of the finger and the kringle-2 domain of tissue-type plasminogen activator with fibrin. Inhibition of kringle-2 binding to fibrin by epsilon-amino caproic acid". *J Biol Chem.* 1986; 261: 14214-8.
- [39] **Brown NJ, Gainer JV, Murphey LJ and Vaughan DE.** "Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-

dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway". *Circulation*. 2000; 102: 2190-6.

- [40] **Brown NJ, Nadeau JH and Vaughan DE.** "Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin". *Thromb Haemost*. 1997; 77: 522-5.
- [41] **Brown NJ, Gainer JV, Stein CM and Vaughan DE.** "Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature". *Hypertension*. 1999; 33: 1431-5.
- [42] **Tsirka SE.** "Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function". *Biochem Soc Trans*. 2002; 30: 222-5.
- [43] **Syrovets T and Simmet T.** "Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin". *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61: 873-85.
- [44] **Fortenberry Y.** "The role of serpins in tumor cell migration". *Biol Chem*. 2015; 396: 205-13.
- [45] **Harpel PC and Cooper NR.** "Studies on human plasma C1 inactivator-enzyme interactions. I. Mechanisms of interaction with C1s, plasmin, and trypsin". *J Clin Invest*. 1975; 55: 593-604.
- [46] **Huisman LG, van Griensven JM and Kluft C.** "On the role of C1-inhibitor as inhibitor of tissue-type plasminogen activator in human plasma". *Thromb Haemost*. 1995; 73: 466-71.
- [47] **Ranby M, Bergsdorf N and Nilsson T.** "Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator". *Thromb Res*. 1982; 27: 175-83.
- [48] **Ratnoff OD, Pensky J, Ogston D and Naff GB.** "The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor, and the C'1r subcomponent of the first component of complement by serum C'1 esterase inhibitor". *J Exp Med*. 1969; 129: 315-31.
- [49] **Sulikowski T and Patston PA.** "The inhibition of TNK-t-PA by C1-inhibitor". *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001; 12: 75-7.
- [50] **Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F and Adam A.** "The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets". *J Pharmacol Sci*. 2005; 99: 6-38.
- [51] **Aoki N, Moroi M, Matsuda M and Tachiya K.** "The behavior of alpha2-plasmin inhibitor in fibrinolytic states". *J Clin Invest*. 1977; 60: 361-9.
- [52] **Harpel PC.** "Alpha2-plasmin inhibitor and alpha2-macroglobulin-plasmin complexes in plasma. Quantitation by an enzyme-linked differential antibody immunosorbent assay". *J Clin Invest*. 1981; 68: 46-55.
- [53] **Emeis JJ and Kooistra T.** "Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells". *J Exp Med*. 1986; 163: 1260-6.
- [54] **Levi M, Hack CE, de Boer JP, Brandjes DP, Buller HR and ten Cate JW.** "Reduction of contact activation related fibrinolytic activity in factor XII deficient patients. Further evidence for the role of the contact system in fibrinolysis in vivo". *J Clin Invest*. 1991; 88: 1155-60.
- [55] **Hack CE.** "The role of factor XII in contact system activation". *Blood*. 1998; 92: 703-4.
- [56] **Cugno M, Hack CE, de Boer JP, Eerenberg AJ, Agostoni A and Cicardi M.** "Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema". *J Lab Clin Med*. 1993; 121: 38-43.
- [57] **Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, et al.** "Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies". *Blood*. 1997; 89: 3213-8.
- [58] **Kaplan AP and Joseph K.** "Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway". *Adv Immunol*. 2014; 121: 41-89.
- [59] **Gosswein T, Kocot A, Emmert G, Kreuz W, Martinez-Saguer I, Aygoren-Pursun E, et al.** "Mutational spectrum of the C1INH (SERPING1) gene in patients with hereditary angioedema". *Cytogenet Genome Res*. 2008; 121: 181-8.
- [60] **Pappalardo E, Caccia S, Suffritti C, Tordai A, Zingale LC and Cicardi M.** "Mutation screening of C1 inhibitor gene in 108 unrelated families with hereditary angioedema: functional and structural correlates". *Mol Immunol*. 2008; 45: 3536-44.

- [61] **Quastel M, Harrison R, Cicardi M, Alper CA and Rosen FS.** "Behavior in vivo of normal and dysfunctional C1 inhibitor in normal subjects and patients with hereditary angioneurotic edema". *J Clin Invest.* 1983; 71: 1041-6.
- [62] **Pappalardo E, Zingale LC and Cicardi M.** "C1 inhibitor gene expression in patients with hereditary angioedema: quantitative evaluation by means of real-time RT-PCR". *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114: 638-44.
- [63] **Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, et al.** "Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond". *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114: S51-131.
- [64] **Bork K, Siedlecki K, Bosch S, Schopf RE and Kreuz W.** "Asphyxiation by laryngeal edema in patients with hereditary angioedema". *Mayo Clin Proc.* 2000; 75: 349-54.
- [65] **Bas M, Bier H, Greve J, Kojda G and Hoffmann TK.** "Novel pharmacotherapy of acute hereditary angioedema with bradykinin B2-receptor antagonist icatibant". *Allergy.* 2006; 61: 1490-2.
- [66] **Agostoni A and Cicardi M.** "Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients". *Medicine (Baltimore).* 1992; 71: 206-15.
- [67] **Frank MM, Gelfand JA and Atkinson JP.** "Hereditary angioedema: the clinical syndrome and its management". *Ann Intern Med.* 1976; 84: 580-93.
- [68] **Winnewisser J, Rossi M, Spath P and Burgi H.** "Type I hereditary angio-oedema. Variability of clinical presentation and course within two large kindreds". *J Intern Med.* 1997; 241: 39-46.
- [69] **Benrajab KM, Singh G and Obah E.** "Hereditary angioedema presenting as irritable bowel syndrome: a case of early closure". *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2015; 5: 29114.
- [70] **Caballero T, Aygoren-Pursun E, Bygum A, Beusterien K, Hautamaki E, Sisic Z, et al.** "The humanistic burden of hereditary angioedema: results from the Burden of Illness Study in Europe". *Allergy Asthma Proc.* 2014; 35: 47-53.
- [71] **Bork K, Meng G, Staubach P and Hardt J.** "Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course". *Am J Med.* 2006; 119: 267-74.
- [72] **Bygum A.** "Hereditary angio-oedema in Denmark: a nationwide survey". *Br J Dermatol.* 2009; 161: 1153-8.
- [73] **Lumry WR, Castaldo AJ, Vernon MK, Blaustein MB, Wilson DA and Horn PT.** "The humanistic burden of hereditary angioedema: Impact on health-related quality of life, productivity, and depression". *Allergy Asthma Proc.* 2010; 31: 407-14.
- [74] **Wilson DA, Bork K, Shea EP, Rentz AM, Blaustein MB and Pullman WE.** "Economic costs associated with acute attacks and long-term management of hereditary angioedema". *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010; 104: 314-20.
- [75] **Bors A, Csuka D, Varga L, Farkas H, Tordai A, Fust G, et al.** "Less severe clinical manifestations in patients with hereditary angioedema with missense C1INH gene mutations". *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 131: 1708-11.
- [76] **Speletas M, Szilagyi A, Psarros F, Moldovan D, Magerl M, Kompoti M, et al.** "Hereditary angioedema: molecular and clinical differences among European populations". *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 135: 570-3.
- [77] **Kalmar L, Bors A, Farkas H, Vas S, Fandl B, Varga L, et al.** "Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema". *Hum Mutat.* 2003; 22: 498.
- [78] **Bowen B, Hawk JJ, Sibunka S, Hovick S and 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.
- [79] **Bygum A, Fagerberg CR, Ponard D, Monnier N, Lunardi J and Drouet C.** "Mutational spectrum and phenotypes in Danish families with hereditary angioedema because of C1 inhibitor deficiency". *Allergy.* 2011; 66: 76-84.

- [80] **Kelemen Z, Moldovan D, Mihaly E, Visy B, Szeplaki G, Csuka D, et al.** "Baseline level of functional C1-inhibitor correlates with disease severity scores in hereditary angioedema". *Clin Immunol*. 2010; 134: 354-8.
- [81] **Visy B, Fust G, Varga L, Szendei G, Takacs E, Karadi I, et al.** "Sex hormones in hereditary angioneurotic oedema". *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004; 60: 508-15.
- [82] **Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Longhurst HJ, Zuraw B, et al.** "2010 International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema". *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010; 6: 24.
- [83] **Caballero T, Farkas H, Bouillet L, Bowen T, Gompel A, Fagerberg C, et al.** "International consensus and practical guidelines on the gynecologic and obstetric management of female patients with hereditary angioedema caused by C1 inhibitor deficiency". *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 308-20.
- [84] **Wagenaar-Bos IG, Drouet C, Aygoren-Pursun E, Bork K, Bucher C, Bygum A, et al.** "Functional C1-inhibitor diagnostics in hereditary angioedema: assay evaluation and recommendations". *J Immunol Methods*. 2008; 338: 14-20.
- [85] **Lopez-Lera A, Garrido S, Roche O and Lopez-Trascasa M.** "SERPING1 mutations in 59 families with hereditary angioedema". *Mol Immunol*. 2011; 49: 18-27.
- [86] **Zuraw BL, Bernstein JA, Lang DM, Craig T, Dreyfus D, Hsieh F, et al.** "A focused parameter update: hereditary angioedema, acquired C1 inhibitor deficiency, and angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema". *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131: 1491-3.
- [87] **Cicardi M, Bork K, Caballero T, Craig T, Li HH, Longhurst H, et al.** "Evidence-based recommendations for the therapeutic management of angioedema owing to hereditary C1 inhibitor deficiency: consensus report of an International Working Group". *Allergy*. 2012; 67: 147-57.
- [88] **Bork K, Bygum A and Hardt J.** "Benefits and risks of danazol in hereditary angioedema: a long-term survey of 118 patients". *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008; 100: 153-61.
- [89] **Zotter Z, Veszeli N, Csuka D, Varga L and Farkas H.** "Frequency of the virilising effects of attenuated androgens reported by women with hereditary angioedema". *Orphanet J Rare Dis*. 2014; 9: 205.
- [90] **Agostoni A, Cicardi M, Martignoni GC, Bergamaschini L and Marasini B.** "Danazol and stanozolol in long-term prophylactic treatment of hereditary angioedema". *J Allergy Clin Immunol*. 1980; 65: 75-9.
- [91] **Bork K and Schneiders V.** "Danazol-induced hepatocellular adenoma in patients with hereditary angio-oedema". *J Hepatol*. 2002; 36: 707-9.
- [92] **Kaplan AP.** "Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: the role of C1 inhibitor therapy". *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126: 918-25.
- [93] **Frank M, Gelfand JA, Alling DW and Sherins RJ.** "Epsilon aminocaproic acid for hereditary angioedema". *N Engl J Med*. 1977; 296: 1235-6.
- [94] **Blohme G.** "Treatment of hereditary angioneurotic oedema with tranexamic acid. A random double-blind cross-over study". *Acta Med Scand*. 1972; 192: 293-8.
- [95] **Zuraw BL, Busse PJ, White M, Jacobs J, Lumry W, Baker J, et al.** "Nanofiltered C1 inhibitor concentrate for treatment of hereditary angioedema". *N Engl J Med*. 2010; 363: 513-22.
- [96] **Van Sickels NJ, Hunsaker RB and Van Sickels JE.** "Hereditary angioedema: treatment, management, and precautions in patients presenting for dental care". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109: 168-72.
- [97] **Craig TJ, Levy RJ, Wasserman RL, Bewtra AK, Hurewitz D, Obtulowicz K, et al.** "Efficacy of human C1 esterase inhibitor concentrate compared with placebo in acute hereditary angioedema attacks". *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 124: 801-8.
- [98] **Waytes AT, Rosen FS and Frank MM.** "Treatment of hereditary angioedema with a vapor-heated C1 inhibitor concentrate". *N Engl J Med*. 1996; 334: 1630-4.

- [99] **Kunschak M, Engl W, Maritsch F, Rosen FS, Eder G, Zerlauth G, et al.** "A randomized, controlled trial to study the efficacy and safety of C1 inhibitor concentrate in treating hereditary angioedema". *Transfusion (Paris)*. 1998; 38: 540-9.
- [100] **Bork K, Frank J, Grundt B, Schlattmann P, Nussberger J and Kreuz W.** "Treatment of acute edema attacks in hereditary angioedema with a bradykinin receptor-2 antagonist (Icatibant)". *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119: 1497-503.
- [101] **Lumry WR, Li HH, Levy RJ, Potter PC, Farkas H, Moldovan D, et al.** "Randomized placebo-controlled trial of the bradykinin B(2) receptor antagonist icatibant for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema: the FAST-3 trial". *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011; 107: 529-37.
- [102] **Longhurst HJ.** "Management of acute attacks of hereditary angioedema: potential role of icatibant". *Vasc Health Risk Manag*. 2010; 6: 795-802.
- [103] **Xu YY, Buyantseva LV, Agarwal NS, Olivieri K, Zhi YX and Craig TJ.** "Update on treatment of hereditary angioedema". *Clin Exp Allergy*. 2013; 43: 395-405.
- [104] **Schneider L, Lumry W, Vegh A, Williams AH and Schmalbach T.** "Critical role of kallikrein in hereditary angioedema pathogenesis: a clinical trial of ecallantide, a novel kallikrein inhibitor". *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120: 416-22.
- [105] **Cicardi M, Levy RJ, McNeil DL, Li HH, Sheffer AL, Campion M, et al.** "Ecallantide for the treatment of acute attacks in hereditary angioedema". *N Engl J Med*. 2010; 363: 523-31.
- [106] **Longhurst H.** "Rhucin, a recombinant C1 inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and cerebral ischemia". *Curr Opin Investig Drugs*. 2008; 9: 310-23.
- [107] **Martinez-Saguer I, Rusicke E, Aygoren-Pursun E, von Hentig N, Klingebiel T and Kreuz W.** "Pharmacokinetic analysis of human plasma-derived pasteurized C1-inhibitor concentrate in adults and children with hereditary angioedema: a prospective study". *Transfusion (Paris)*. 2010; 50: 354-60.
- [108] **Christiansen SC, Bygum A, Banerji A, Busse P, Li H, Lumry W, et al.** "Before and after, the impact of available on-demand treatment for HAE". *Allergy Asthma Proc*. 2015; 36: 145-50.
- [109] **Bygum A, Aygoren-Pursun E, Beusterien K, Hautamaki E, Sisic Z, Wait S, et al.** "Burden of Illness in Hereditary Angioedema: A Conceptual Model". *Acta Derm Venereol*. 2014.
- [110] **Banerji A.** "The burden of illness in patients with hereditary angioedema". *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013; 111: 329-36.
- [111] **Fouche AS, Saunders EF and Craig T.** "Depression and anxiety in patients with hereditary angioedema". *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014; 112: 371-5.
- [112] **Bewtra AK, Levy RJ, Jacobson KW, Wasserman RL, Machnig T and Craig TJ.** "C1-inhibitor therapy for hereditary angioedema attacks: prospective patient assessments of health-related quality of life". *Allergy Asthma Proc*. 2012; 33: 427-31.
- [113] **Bygum A, Andersen KE and Mikkelsen CS.** "Self-administration of intravenous C1-inhibitor therapy for hereditary angioedema and associated quality of life benefits". *Eur J Dermatol*. 2009; 19: 147-51.
- [114] **Bork K, Barnstedt SE, Koch P and Traupe H.** "Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women". *Lancet*. 2000; 356: 213-7.
- [115] **Zuraw BL, Bork K, Binkley KE, Banerji A, Christiansen SC, Castaldo A, et al.** "Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor function: consensus of an international expert panel". *Allergy Asthma Proc*. 2012; 33 Suppl 1: S145-56.
- [116] **Lang DM, Aberer W, Bernstein JA, Chng HH, Grumach AS, Hide M, et al.** "International consensus on hereditary and acquired angioedema". *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012; 109: 395-402.
- [117] **Dewald G and Bork K.** "Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor". *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 343: 1286-9.

- [118] **Bork K, Wulff K, Meinke P, Wagner N, Hardt J and Witzke G.** "A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor". *Clin Immunol.* 2011; 141: 31-5.
- [119] **Klein-Hitpass L, Tsai SY, Greene GL, Clark JH, Tsai MJ and O'Malley BW.** "Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element". *Mol Cell Biol.* 1989; 9: 43-9.
- [120] **Gordon EM, Williams SR, Frenck B, Mazur CA and Speroff L.** "Dose-dependent effects of postmenopausal estrogen and progestin on antithrombin III and factor XII". *J Lab Clin Med.* 1988; 111: 52-6.
- [121] **Melamed J, Alper CA, Cicardi M and Rosen FS.** "The metabolism of C1 inhibitor and C1q in patients with acquired C1-inhibitor deficiency". *J Allergy Clin Immunol.* 1986; 77: 322-6.
- [122] **Cicardi M and Zanichelli A.** "Acquired angioedema". *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2010; 6: 14.
- [123] **Hauptmann G, Lang JM, North ML, Oberling F, Mayer G and Lachmann P.** "Acquired c1-inhibitor deficiencies in lymphoproliferative diseases with serum immunoglobulin abnormalities. A study of three cases". *Blut.* 1976; 32: 195-206.
- [124] **Castelli R, Deliliers DL, Zingale LC, Pogliani EM and Cicardi M.** "Lymphoproliferative disease and acquired C1 inhibitor deficiency". *Haematologica.* 2007; 92: 716-8.
- [125] **Alsens J, Bork K and Loos M.** "Autoantibody-mediated acquired deficiency of C1 inhibitor". *N Engl J Med.* 1987; 316: 1360-6.
- [126] **Jackson J, Sim RB, Whelan A and Feighery C.** "An IgG autoantibody which inactivates C1-inhibitor". *Nature.* 1986; 323: 722-4.
- [127] **Mandle R, Baron C, Roux E, Sundel R, Gelfand J, Aulak K, et al.** "Acquired C1 inhibitor deficiency as a result of an autoantibody to the reactive center region of C1 inhibitor". *J Immunol.* 1994; 152: 4680-5.
- [128] **He S, Tsang S, North J, Chohan N, Sim RB and Whaley K.** "Epitope mapping of C1 inhibitor autoantibodies from patients with acquired C1 inhibitor deficiency". *J Immunol.* 1996; 156: 2009-13.
- [129] **Cicardi M, Beretta A, Colombo M, Gioffre D, Cugno M and Agostoni A.** "Relevance of lymphoproliferative disorders and of anti-C1 inhibitor autoantibodies in acquired angio-oedema". *Clin Exp Immunol.* 1996; 106: 475-80.
- [130] **Cicardi M, Zingale LC, Pappalardo E, Folcioni A and Agostoni A.** "Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1-inhibitor deficiencies". *Medicine (Baltimore).* 2003; 82: 274-81.
- [131] **Nettis E, Colanardi MC, Loria MP and Vacca A.** "Acquired C1-inhibitor deficiency in a patient with systemic lupus erythematosus: a case report and review of the literature". *Eur J Clin Invest.* 2005; 35: 781-4.
- [132] **Ochonisky S, Intrator L, Wechsler J, Revuz J and Bagot M.** "Acquired C1 inhibitor deficiency revealing systemic lupus erythematosus". *Dermatology.* 1993; 186: 261-3.
- [133] **Wasserfallen JB, Spaeth P, Guillou L and Pecoud AR.** "Acquired deficiency in C1-inhibitor associated with signet ring cell gastric adenocarcinoma: a probable connection of antitumor-associated antibodies, hemolytic anemia, and complement turnover". *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 95: 124-31.
- [134] **Cohen SH, Koethe SM, Kozin F, Rodey G, Arkins JA and Fink JN.** "Acquired angioedema associated with rectal carcinoma and its response to danazol therapy. Acquired angioedema treated with danazol". *J Allergy Clin Immunol.* 1978; 62: 217-21.
- [135] **Israili ZH and Hall WD.** "Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology". *Ann Intern Med.* 1992; 117: 234-42.
- [136] **Slater EE, Merrill DD, Guess HA, Roylance PJ, Cooper WD, Inman WH, et al.** "Clinical profile of angioedema associated with angiotensin converting-enzyme inhibition". *JAMA.* 1988; 260: 967-70.

- [137] **Abbosh J, Anderson JA, Levine AB and Kupin WL.** "Angiotensin converting enzyme inhibitor-induced angioedema more prevalent in transplant patients". *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999; 82: 473-6.
- [138] **Brown NJ, Ray WA, Snowden M and Griffin MR.** "Black Americans have an increased rate of angiotensin converting enzyme inhibitor-associated angioedema". *Clin Pharmacol Ther.* 1996; 60: 8-13.
- [139] **Kostis JB, Kim HJ, Rusnak J, Casale T, Kaplan A, Corren J, et al.** "Incidence and characteristics of angioedema associated with enalapril". *Arch Intern Med.* 2005; 165: 1637-42.
- [140] **Schmidt TD and McGrath KM.** "Angiotensin-converting enzyme inhibitor angioedema of the intestine: a case report and review of the literature". *Am J Med Sci.* 2002; 324: 106-8.
- [141] **Brown NJ, Snowden M and Griffin MR.** "Recurrent angiotensin-converting enzyme inhibitor--associated angioedema". *JAMA.* 1997; 278: 232-3.
- [142] **Gabb GM, Ryan P, Wing LM and Hutchinson KA.** "Epidemiological study of angioedema and ACE inhibitors". *Aust N Z J Med.* 1996; 26: 777-82.
- [143] **Agostoni A, Cicardi M, Cugno M, Zingale LC, Gioffre D and Nussberger J.** "Angioedema due to angiotensin-converting enzyme inhibitors". *Immunopharmacology.* 1999; 44: 21-5.
- [144] **Bas M, Greve J, Stelter K, Bier H, Stark T, Hoffmann TK, et al.** "Therapeutic Efficacy of Icatibant in Angioedema Induced by Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: A Case Series". *Ann Emerg Med.* 2010.
- [145] **Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A and Agostoni A.** "Plasma bradykinin in angio-oedema". *Lancet.* 1998; 351: 1693-7.
- [146] **Molinaro G, Cugno M, Perez M, Lepage Y, Gervais N, Agostoni A, et al.** "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.
- [147] **Cyr M, Lepage Y, Blais C, Jr., Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, et al.** "Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H275-H83.
- [148] **Adam A, Cugno M, Molinaro G, Perez M, Lepage Y and Agostoni A.** "Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors". *Lancet.* 2002; 359: 2088-9.
- [149] **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: 617-26.
- [150] **Byrd JB, Touzin K, Sile S, Gainer JV, Yu C, Nadeau J, et al.** "Dipeptidyl peptidase IV in angiotensin-converting enzyme inhibitor associated angioedema". *Hypertension.* 2008; 51: 141-7.
- [151] **Blais C, Jr., Rouleau JL, Brown NJ, Lepage Y, Spence D, Munoz C, et al.** "Serum metabolism of bradykinin and des-Arg9-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema". *Immunopharmacology.* 1999; 43: 293-302.
- [152] **Colman RW.** "Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system". *J Clin Invest.* 1984; 73: 1249-53.
- [153] **Ratnoff OD and Colopy JE.** "A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma". *J Clin Invest.* 1955; 34: 602-13.
- [154] **Ratnoff OD, Davie EW and Mallett DL.** "Studies on the action of Hageman factor: evidence that activated Hageman factor in turn activates plasma thromboplastin antecedent". *J Clin Invest.* 1961; 40: 803-19.
- [155] **Royle NJ, Nigli M, Cool D, MacGillivray RT and Hamerton JL.** "Structural gene encoding human factor XII is located at 5q33-qter". *Somat Cell Mol Genet.* 1988; 14: 217-21.
- [156] **Farsetti A, Misiti S, Citarella F, Felici A, Andreoli M, Fantoni A, et al.** "Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression". *Endocrinology.* 1995; 136: 5076-83.
- [157] **Forbes CD, Pensky J and Ratnoff OD.** "Inhibition of activated Hageman factor and activated plasma thromboplastin antecedent by purified serum C1 inactivator". *J Lab Clin Med.* 1970; 76: 809-15.

- [158] **Petersen TE, Thogersen HC, Skorstengaard K, Vibe-Pedersen K, Sahl P, Sottrup-Jensen L, et al.** "Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80: 137-41.
- [159] **Stavrou E and Schmaier AH.** "Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis". *Thromb Res*. 2010; 125: 210-5.
- [160] **Yamada KM.** "Cell surface interactions with extracellular materials". *Annu Rev Biochem*. 1983; 52: 761-99.
- [161] **Clarke BJ, Cote HC, Cool DE, Clark-Lewis I, Saito H, Pixley RA, et al.** "Mapping of a putative surface-binding site of human coagulation factor XII". *J Biol Chem*. 1989; 264: 11497-502.
- [162] **Samuel M, Samuel E and Villanueva GB.** "Histidine residues are essential for the surface binding and autoactivation of human coagulation factor XII". *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 191: 110-7.
- [163] **Pixley RA, Stumpo LG, Birkmeyer K, Silver L and Colman RW.** "A monoclonal antibody recognizing an icosapeptide sequence in the heavy chain of human factor XII inhibits surface-catalyzed activation". *J Biol Chem*. 1987; 262: 10140-5.
- [164] **Citarella F, Fedele G, Roem D, Fantoni A and Hack CE.** "The second exon-encoded factor XII region is involved in the interaction of factor XII with factor XI and does not contribute to the binding site for negatively charged surfaces". *Blood*. 1998; 92: 4198-206.
- [165] **Bradford HN, Pixley RA and Colman RW.** "Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation". *J Biol Chem*. 2000; 275: 22756-63.
- [166] **Henderson LM, Figueroa CD, Muller-Esterl W and Bhoola KD.** "Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane". *Blood*. 1994; 84: 474-82.
- [167] **Mahdi F, Madar ZS, Figueroa CD and Schmaier AH.** "Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes". *Blood*. 2002; 99: 3585-96.
- [168] **Cool DE, Edgell CJ, Louie GV, Zoller MJ, Brayer GD and MacGillivray RT.** "Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. Prediction of the primary structure of factor XII and the tertiary structure of beta-factor XIIa". *J Biol Chem*. 1985; 260: 13666-76.
- [169] **Citarella F, te Velthuis H, Helmer-Citterich M and Hack CE.** "Identification of a putative binding site for negatively charged surfaces in the fibronectin type II domain of human factor XII--an immunochemical and homology modeling approach". *Thromb Haemost*. 2000; 84: 1057-65.
- [170] **Revak SD, Cochrane CG and Griffin JH.** "The binding and cleavage characteristics of human Hageman factor during contact activation. A comparison of normal plasma with plasmas deficient in factor XI, prekallikrein, or high molecular weight kininogen". *J Clin Invest*. 1977; 59: 1167-75.
- [171] **Fujikawa K and McMullen BA.** "Amino acid sequence of human beta-factor XIIa". *J Biol Chem*. 1983; 258: 10924-33.
- [172] **Dunn JT, Silverberg M and Kaplan AP.** "The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kallikrein". *J Biol Chem*. 1982; 257: 1779-84.
- [173] **Revak SD, Cochrane CG, Bouma BN and Griffin JH.** "Surface and fluid phase activities of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma". *J Exp Med*. 1978; 147: 719-29.
- [174] **DiScipio RG.** "The activation of the alternative pathway C3 convertase by human plasma kallikrein". *Immunology*. 1982; 45: 587-95.
- [175] **Ghebrehiwet B, Silverberg M and Kaplan AP.** "Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment". *J Exp Med*. 1981; 153: 665-76.
- [176] **Wiggins RC, Giclas PC and Henson PM.** "Chemotactic activity generated from the fifth component of complement by plasma kallikrein of the rabbit". *J Exp Med*. 1981; 153: 1391-404.
- [177] **Chen X, Wang J, Paszti Z, Wang F, Schrauben JN, Tarabara VV, et al.** "Ordered adsorption of coagulation factor XII on negatively charged polymer surfaces probed by sum frequency generation vibrational spectroscopy". *Anal Bioanal Chem*. 2007; 388: 65-72.

- [178] **Samuel M, Pixley RA, Villanueva MA, Colman RW and Villanueva GB.** "Human factor XII (Hageman factor) autoactivation by dextran sulfate. Circular dichroism, fluorescence, and ultraviolet difference spectroscopic studies". *J Biol Chem.* 1992; 267: 19691-7.
- [179] **Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, et al.** "Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis". *J Exp Med.* 2006; 203: 513-8.
- [180] **Renne T, Schmaier AH, Nickel KF, Blomback M and Maas C.** "In vivo roles of factor XII". *Blood.* 2012; 120: 4296-303.
- [181] **Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al.** "Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 6388-93.
- [182] **Smith SA and Morrissey JH.** "Polyphosphate as a general procoagulant agent". *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 1750-6.
- [183] **Maas C, Govers-Riemslog JW, Bouma B, Schiks B, Hazenberg BP, Lokhorst HM, et al.** "Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation". *J Clin Invest.* 2008; 118: 3208-18.
- [184] **Schmaier AH and Larusch G.** "Factor XII: new life for an old protein". *Thromb Haemost.* 2010; 104: 915-8.
- [185] **Shariat-Madar Z, Mahdi F and Schmaier AH.** "Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator". *J Biol Chem.* 2002; 277: 17962-9.
- [186] **Shariat-Madar Z, Mahdi F and Schmaier AH.** "Recombinant prolylcarboxypeptidase activates plasma prekallikrein". *Blood.* 2004; 103: 4554-61.
- [187] **Joseph K, Tholanikunnel BG and Kaplan AP.** "Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 896-900.
- [188] **Davis AE, 3rd.** "Biological effects of C1 inhibitor". *Drug News Perspect.* 2004; 17: 439-46.
- [189] **Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, et al.** "A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level". *Blood.* 1998; 91: 2010-4.
- [190] **Calafell F, Almasy L, Sabater-Lleal M, Buil A, Mordillo C, Ramirez-Soriano A, et al.** "Sequence variation and genetic evolution at the human F12 locus: mapping quantitative trait nucleotides that influence FXII plasma levels". *Hum Mol Genet.* 2010; 19: 517-25.
- [191] **Colhoun HM, Zito F, Norman Chan N, Rubens MB, Fuller JH and Humphries SE.** "Activated factor XII levels and factor XII 46C>T genotype in relation to coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes and healthy subjects". *Atherosclerosis.* 2002; 163: 363-9.
- [192] **The Database of Short Genetic Variation (dbSNP).** "Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1801020". *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801020
- [193] **Santamaria A, Martinez-Rubio A, Mateo J, Tirado I, Soria JM and Fontcuberta J.** "Homozygosity of the T allele of the 46 C-->T polymorphism in the F12 gene is a risk factor for acute coronary artery disease in the Spanish population". *Haematologica.* 2004; 89: 878-9.
- [194] **Zito F, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD and Humphries SE.** "Association of the factor XII 46C>T polymorphism with risk of coronary heart disease (CHD) in the WOSCOPS study". *Atherosclerosis.* 2002; 165: 153-8.
- [195] **Endler G, Mannhalter C, Sunder-Plassmann H, Lalouschek W, Kapiotis S, Exner M, et al.** "Homozygosity for the C-->T polymorphism at nucleotide 46 in the 5' untranslated region of the factor XII gene protects from development of acute coronary syndrome". *Br J Haematol.* 2001; 115: 1007-9.

- [196] **Doggen CJ, Rosendaal FR and Meijers JC.** "Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: Opposite and synergistic effects of factors XI and XII". *Blood*. 2006; 108: 4045-51.
- [197] **Bach J, Endler G, Winkelmann BR, Boehm BO, Maerz W, Mannhalter C, et al.** "Coagulation factor XII (FXII) activity, activated FXII, distribution of FXII C46T gene polymorphism and coronary risk". *J Thromb Haemost*. 2008; 6: 291-6.
- [198] **Qi L, Li JM, Sun H, Huang XQ, Lin KQ, Chu JY, et al.** "[Association between gene polymorphisms and myocardial infarction in Han Chinese of Yunnan province]". *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2012; 29: 413-9.
- [199] **Athanasiadis G, Esteban E, Vidal MG, Torres RC, Bahri R and Moral P.** "Polymorphism FXII 46C>T and cardiovascular risk: additional data from Spanish and Tunisian patients". *BMC Res Notes*. 2009; 2: 154.
- [200] **Caamano J, Jaramillo PC, Lanas C, Lanas F and Salazar LA.** "Factor XII 46C --> T gene polymorphism in Chilean subjects with coronary artery disease and controls". *Med Princ Pract*. 2009; 18: 137-42.
- [201] **Kohler HP, Futers TS and Grant PJ.** "FXII (46C-->T) polymorphism and in vivo generation of FXII activity--gene frequencies and relationship in patients with coronary artery disease". *Thromb Haemost*. 1999; 81: 745-7.
- [202] **Santamaria A, Mateo J, Tirado I, Oliver A, Belvis R, Marti-Fabregas J, et al.** "Homozygosity of the T allele of the 46 C->T polymorphism in the F12 gene is a risk factor for ischemic stroke in the Spanish population". *Stroke*. 2004; 35: 1795-9.
- [203] **del Rio-Espinola A, Fernandez-Cadenas I, Giralt D, Quiroga A, Gutierrez-Agullo M, Quintana M, et al.** "A predictive clinical-genetic model of tissue plasminogen activator response in acute ischemic stroke". *Ann Neurol*. 2012; 72: 716-29.
- [204] **Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, et al.** "A quantitative-trait locus in the human factor XII gene influences both plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease". *Am J Hum Genet*. 2002; 70: 567-74.
- [205] **Tirado I, Soria JM, Mateo J, Oliver A, Souto JC, Santamaria A, et al.** "Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C-->T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis". *Thromb Haemost*. 2004; 91: 899-904.
- [206] **Bertina RM, Poort SR, Vos HL and Rosendaal FR.** "The 46C-->T polymorphism in the factor XII gene (F12) and the risk of venous thrombosis". *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 597-9.
- [207] **El-Galaly TC, Severinsen MT, Overvad K, Steffensen R, Vistisen AK, Tjønneland A, et al.** "Single nucleotide polymorphisms and the risk of venous thrombosis: results from a Danish case-cohort study". *Br J Haematol*. 2013; 160: 838-41.
- [208] **Johnson CY, Tuite A, Morange PE, Tregouet DA and Gagnon F.** "The factor XII -4C>T variant and risk of common thrombotic disorders: A HuGE review and meta-analysis of evidence from observational studies". *Am J Epidemiol*. 2011; 173: 136-44.
- [209] **Walch K, Riener EK, Tempfer CB, Endler G, Huber JC and Unfried G.** "The C46T polymorphism of the coagulation factor XII gene and idiopathic recurrent miscarriage". *BJOG*. 2005; 112: 1434-6.
- [210] **Iinuma Y, Sugiura-Ogasawara M, Makino A, Ozaki Y, Suzumori N and Suzumori K.** "Coagulation factor XII activity, but not an associated common genetic polymorphism (46C/T), is linked to recurrent miscarriage". *Fertil Steril*. 2002; 77: 353-6.
- [211] **Asano E, Ebara T, Yamada-Namikawa C, Kitaori T, Suzumori N, Katano K, et al.** "Genotyping analysis for the 46 C/T polymorphism of coagulation factor XII and the involvement of factor XII activity in patients with recurrent pregnancy loss". *PLoS One*. 2014; 9: e114452.
- [212] **Weger M, Renner W, Steinbrugger I, Cichocki L, Temmel W, Stanger O, et al.** "Role of thrombophilic gene polymorphisms in branch retinal vein occlusion". *Ophthalmology*. 2005; 112: 1910-5.

- [213] **Mandle RJ, Colman RW and Kaplan AP.** "Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976; 73: 4179-83.
- [214] **Bhoola KD, Figueroa CD and Worthy K.** "Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases". *Pharmacol Rev.* 1992; 44: 1-80.
- [215] **Reddigari S and Kaplan AP.** "Quantification of human high molecular weight kininogen by immunoblotting with a monoclonal anti-light chain antibody". *J Immunol Methods.* 1989; 119: 19-25.
- [216] **Hasan AA, Zisman T and Schmaier AH.** "Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 3615-20.
- [217] **Shariat-Madar Z, Mahdi F and Schmaier AH.** "Mapping binding domains of kininogens on endothelial cell cytokeratin 1". *J Biol Chem.* 1999; 274: 7137-45.
- [218] **Herwald H, Dedio J, Kellner R, Loos M and Muller-Esterl W.** "Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells. Identity with the gC1q receptor". *J Biol Chem.* 1996; 271: 13040-7.
- [219] **Joseph K, Ghebrehiwet B, Peerschke EI, Reid KB and Kaplan AP.** "Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: identity with the receptor that binds to the globular "heads" of C1q (gC1q-R)". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 8552-7.
- [220] **Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S, Yan W, Wang J, Mazar A, et al.** "Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor". *J Clin Invest.* 1997; 100: 1481-7.
- [221] **Schmaier AH.** "Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions". *Curr Opin Hematol.* 2000; 7: 261-5.
- [222] **Schmaier AH and McCrae KR.** "The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation". *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 2323-9.
- [223] **Babiuk C, Marceau F, St-Pierre S and Regoli D.** "Kininases and vascular responses to kinins". *Eur J Pharmacol.* 1982; 78: 167-74.
- [224] **Cugno M, Cicardi M, Coppola R and Agostoni A.** "Activation of factor XII and cleavage of high molecular weight kininogen during acute attacks in hereditary and acquired C1-inhibitor deficiencies". *Immunopharmacology.* 1996; 33: 361-4.
- [225] **Adam A, Albert A, Calay G, Closset J, Damas J and Franchimont P.** "Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values". *Clin Chem.* 1985; 31: 423-6.
- [226] **Higashiyama S, Ohkubo I, Ishiguro H, Sasaki M, Matsuda T and Nakamura R.** "Heavy chain of human high molecular weight and low molecular weight kininogens binds calcium ion". *Biochemistry.* 1987; 26: 7450-8.
- [227] **Salvesen G, Parkes C, Abrahamson M, Grubb A and Barrett AJ.** "Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases". *Biochem J.* 1986; 234: 429-34.
- [228] **Jiang YP, Muller-Esterl W and Schmaier AH.** "Domain 3 of kininogens contains a cell-binding site and a site that modifies thrombin activation of platelets". *J Biol Chem.* 1992; 267: 3712-7.
- [229] **Hasan AA, Cines DB, Ngaiza JR, Jaffe EA and Schmaier AH.** "High-molecular-weight kininogen is exclusively membrane bound on endothelial cells to influence activation of vascular endothelium". *Blood.* 1995; 85: 3134-43.
- [230] **Colman RW, Jameson BA, Lin Y, Johnson D and Mousa SA.** "Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis". *Blood.* 2000; 95: 543-50.

- [231] **Lin Y, Pixley RA and Colman RW.** "Kinetic analysis of the role of zinc in the interaction of domain 5 of high-molecular weight kininogen (HK) with heparin". *Biochemistry*. 2000; 39: 5104-10.
- [232] **Tait JF and Fujikawa K.** "Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI". *J Biol Chem*. 1987; 262: 11651-6.
- [233] **Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, Yamashita T, et al.** "Bradykinin stimulates type II alveolar cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity and inflammatory cytokines". *Am J Pathol*. 1998; 153: 1885-93.
- [234] **Golias C, Charalabopoulos A, Stagikas D, Charalabopoulos K and Batistatou A.** "The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin". *Hippokratia*. 2007; 11: 124-8.
- [235] **Wu J, Akaike T, Hayashida K, Miyamoto Y, Nakagawa T, Miyakawa K, et al.** "Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues". *Int J Cancer*. 2002; 98: 29-35.
- [236] **Nussberger J, Cugno M and Cicardi M.** "Bradykinin-mediated angioedema". *N Engl J Med*. 2002; 347: 621-2.
- [237] **Nussberger J, Cugno M, Cicardi M and Agostoni A.** "Local bradykinin generation in hereditary angioedema". *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104: 1321-2.
- [238] **Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J and Davis AE, 3rd.** "Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor". *J Clin Invest*. 2002; 109: 1057-63.
- [239] **Han Lee ED, Pappalardo E, Scafidi J and Davis AE, 3rd.** "Approaches toward reversal of increased vascular permeability in C1 inhibitor deficient mice". *Immunol Lett*. 2003; 89: 155-60.
- [240] **Ueno A and Oh-ishi S.** "Roles for the kallikrein-kinin system in inflammatory exudation and pain: lessons from studies on kininogen-deficient rats". *J Pharmacol Sci*. 2003; 93: 1-20.
- [241] **Flavahan NA and Vanhoutte PM.** "G-proteins and endothelial responses". *Blood Vessels*. 1990; 27: 218-29.
- [242] **Rodrigues ES, Martin RP, Silva RF, Nakaie CR, Oliveira L and Shimuta SI.** "Binding affinities and activation of Asp712Ala and Cys100Ser mutated kinin B1 receptor forms suggest a bimodal scheme for the molecule of bound-DABK". *Regul Pept*. 2013; 181: 37-44.
- [243] **Chai KX, Ni A, Wang D, Ward DC, Chao J and Chao L.** "Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1". *Genomics*. 1996; 31: 51-7.
- [244] **Bachvarov DR, Hess JF, Menke JG, Larrivee JF and Marceau F.** "Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1)". *Genomics*. 1996; 33: 374-81.
- [245] **Ross D and Joyner WL.** "Resting distribution and stimulated translocation of protein kinase C isoforms alpha, epsilon and zeta in response to bradykinin and TNF in human endothelial cells". *Endothelium*. 1997; 5: 321-32.
- [246] **Marceau F.** "Kinin B1 receptors: a review". *Immunopharmacology*. 1995; 30: 1-26.
- [247] **Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, et al.** "Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor". *J Biol Chem*. 1994; 269: 21583-6.
- [248] **Wang DZ, Chao L and Chao J.** "Cellular localization of bradykinin B1 receptor mRNA in the human kidney". *Immunopharmacology*. 1996; 33: 151-6.
- [249] **Braun A, Kammerer S, Bohme E, Muller B and Roscher AA.** "Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B2 receptor gene". *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 211: 234-40.
- [250] **Hall JM.** "Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles". *Pharmacol Ther*. 1992; 56: 131-90.
- [251] **Zeitlin IJ and Smith AN.** "Mobilization of tissue kallikrein in inflammatory disease of the colon". *Gut*. 1973; 14: 133-8.

- [252] **Smith KA.** "T-cell growth factor". *Immunol Rev.* 1980; 51: 337-57.
- [253] **Kaya H, Patton GM and Hong SL.** "Bradykinin-induced activation of phospholipase A2 is independent of the activation of polyphosphoinositide-hydrolyzing phospholipase C". *J Biol Chem.* 1989; 264: 4972-7.
- [254] **Gaginella TS and Kachur JF.** "Kinins as mediators of intestinal secretion". *Am J Physiol.* 1989; 256: G1-15.
- [255] **Marceau F, Barabe J, St-Pierre S and Regoli D.** "Kinin receptors in experimental inflammation". *Can J Physiol Pharmacol.* 1980; 58: 536-42.
- [256] **Collier HO and Shorley PG.** "Analgesic antipyretic drugs as antagonists of bradykinin". *Br J Pharmacol Chemother.* 1960; 15: 601-10.
- [257] **Issandou M and Darbon JM.** "Activation of protein kinase C by phorbol esters induces DNA synthesis and protein phosphorylations in glomerular mesangial cells". *FEBS Lett.* 1991; 281: 196-200.
- [258] **Marceau F, Lussier A, Regoli D and Giroud JP.** "Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation". *Gen Pharmacol.* 1983; 14: 209-29.
- [259] **Ljunggren O and Lerner UH.** "Evidence for BK1 bradykinin-receptor-mediated prostaglandin formation in osteoblasts and subsequent enhancement of bone resorption". *Br J Pharmacol.* 1990; 101: 382-6.
- [260] **Bachvarov DR, Landry M, Pelletier I, Chevrette M, Betard C, Houde I, et al.** "Characterization of two polymorphic sites in the human kinin B1 receptor gene: altered frequency of an allele in patients with a history of end-stage renal failure". *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9: 598-604.
- [261] **The Database of Short Genetic Variation (dbSNP).** "Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs4905475". *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4905475
- [262] **Knigge H, Bluthner M, Bruntgens A, Sator H and Ritz E.** "G(-699)/C polymorphism in the bradykinin-1 receptor gene in patients with renal failure". *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: 586-8.
- [263] **Zychma MJ, Gumprecht J, Trautsolt W, Szydłowska I and Grzeszczak W.** "Polymorphic genes for kinin receptors, nephropathy and blood pressure in type 2 diabetic patients". *Am J Nephrol.* 2003; 23: 112-6.
- [264] **Bachvarov DR, Landry M, Houle S, Pare P and Marceau F.** "Altered frequency of a promoter polymorphic allele of the kinin B1 receptor gene in inflammatory bowel disease". *Gastroenterology.* 1998; 115: 1045-8.
- [265] **Coates D, Isaac RE, Cotton J, Siviter R, Williams TA, Shirras A, et al.** "Functional conservation of the active sites of human and Drosophila angiotensin I-converting enzyme". *Biochemistry.* 2000; 39: 8963-9.
- [266] **Hubert C, Houot AM, Corvol P and 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: 15377-83.
- [267] **El-Dorry HA, Pickett CB, MacGregor JS and Soffer RL.** "Tissue-specific expression of mRNAs for dipeptidyl carboxypeptidase isoenzymes". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79: 4295-7.
- [268] **Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, et al.** "Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice". *Nature.* 1995; 375: 146-8.
- [269] **Oppong SY and Hooper NM.** "Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane". *Biochem J.* 1993; 292 (Pt 2): 597-603.
- [270] **Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al.** "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9". *Circ Res.* 2000; 87: E1-9.

- [271] **Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al.** "Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase". *J Biol Chem.* 2002; 277: 14838-43.
- [272] **Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM and Witteman JC.** "ACE polymorphisms". *Circ Res.* 2006; 98: 1123-33.
- [273] **Erdos EG and Skidgel RA.** "The angiotensin I-converting enzyme". *Lab Invest.* 1987; 56: 345-8.
- [274] **Brewster UC and Perazella MA.** "The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease". *Am J Med.* 2004; 116: 263-72.
- [275] **Carluccio M, Soccio M and De Caterina R.** "Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system". *Eur J Clin Invest.* 2001; 31: 476-88.
- [276] **Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al.** "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone". *J Clin Invest.* 1996; 97: 1916-23.
- [277] **Hu J, Igarashi A, Kamata M and Nakagawa H.** "Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity". *J Biol Chem.* 2001; 276: 47863-8.
- [278] **Selkoe DJ.** "The molecular pathology of Alzheimer's disease". *Neuron.* 1991; 6: 487-98.
- [279] **van Duijn CM, Hendriks L, Cruts M, Hardy JA, Hofman A and Van Broeckhoven C.** "Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset Alzheimer's disease". *Lancet.* 1991; 337: 978.
- [280] **Mellick GD, Buchanan DD, McCann SJ, Davis DR, Le Couteur DG, Chan D, et al.** "The ACE deletion polymorphism is not associated with Parkinson's disease". *Eur Neurol.* 1999; 41: 103-6.
- [281] **Hong CJ, Wang YC and Tsai SJ.** "Association study of angiotensin I-converting enzyme polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders". *J Neural Transm (Vienna).* 2002; 109: 1209-14.
- [282] **Baghai TC, Schule C, Zill P, Deiml T, Eser D, Zwanzger P, et al.** "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.
- [283] **Baghai TC, Schule C, Zwanzger P, Minov C, Zill P, Ella R, et al.** "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.
- [284] **Inomata N.** "Recent advances in drug-induced angioedema". *Allergol Int.* 2012; 61: 545-57.
- [285] **Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D, Warnet JM and 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: 33-9.
- [286] **Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P and Soubrier F.** "An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels". *J Clin Invest.* 1990; 86: 1343-6.
- [287] **Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, et al.** "Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism". *Circulation.* 1995; 92: 1387-8.
- [288] **Costerousse O, Allegrini J, Lopez M and Alhenc-Gelas F.** "Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes". *Biochem J.* 1993; 290 (Pt 1): 33-40.
- [289] **Ueda S, Elliott HL, Morton JJ and 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.

- [290] **Brown NJ and Vaughan DE.** "Angiotensin-converting enzyme inhibitors". *Circulation*. 1998; 97: 1411-20.
- [291] **Bantis C, Heering PJ, Luther Y, Aker S, Kuhr N, Grabensee B, et al.** "Influence of cytokine gene polymorphisms on focal segmental glomerulosclerosis". *Am J Nephrol*. 2004; 24: 427-31.
- [292] **Rice GI, Foy CA and Grant PJ.** "Angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1-receptor gene polymorphisms and risk of ischaemic heart disease". *Cardiovasc Res*. 1999; 41: 746-53.
- [293] **Rigat B, Hubert C, Corvol P and 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.
- [294] **Shanmugam V, Sell KW and Saha BK.** "Mistyping ACE heterozygotes". *PCR Methods Appl*. 1993; 3: 120-1.
- [295] **Villard E, Tired L, Visvikis S, Rakotovo R, Cambien F and 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: 1268-78.
- [296] **Farrall M, Keavney B, McKenzie C, Delepine M, Matsuda F and Lathrop GM.** "Fine-mapping of an ancestral recombination breakpoint in DCP1". *Nat Genet*. 1999; 23: 270-1.
- [297] **Keavney B, McKenzie CA, Connell JM, Julier C, Ratcliffe PJ, Sobel E, et al.** "Measured haplotype analysis of the angiotensin-I converting enzyme gene". *Hum Mol Genet*. 1998; 7: 1745-51.
- [298] **Zhu X, McKenzie CA, Forrester T, Nickerson DA, Broeckel U, Schunkert H, et al.** "Localization of a small genomic region associated with elevated ACE". *Am J Hum Genet*. 2000; 67: 1144-53.
- [299] **Soubrier F, Martin S, Alonso A, Visvikis S, Tired L, Matsuda F, et al.** "High-resolution genetic mapping of the ACE-linked QTL influencing circulating ACE activity". *Eur J Hum Genet*. 2002; 10: 553-61.
- [300] **Cox R, Bouzekri N, Martin S, Southam L, Hugill A, Golamaully M, et al.** "Angiotensin-1-converting enzyme (ACE) plasma concentration is influenced by multiple ACE-linked quantitative trait nucleotides". *Hum Mol Genet*. 2002; 11: 2969-77.
- [301] **McKenzie CA, Sinsheimer JS, Adeyemo AA, Cox RD, Southam L, Hugill A, et al.** "SNP haplotypes in the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene: analysis of Nigerian family data using gamete competition models". *Ann Hum Genet*. 2005; 69: 227-32.
- [302] **Kammerer CM, Gouin N, Samollow PB, VandeBerg JF, Hixson JE, Cole SA, et al.** "Two quantitative trait loci affect ACE activities in Mexican-Americans". *Hypertension*. 2004; 43: 466-70.
- [303] **Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR and Lalouel JM.** "Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension". *Nat Genet*. 1992; 1: 72-5.
- [304] **Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, et al.** "Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy". *N Engl J Med*. 1994; 330: 1634-8.
- [305] **Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y and Kinoshita M.** "DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy". *Circulation*. 1994; 90: 2622-8.
- [306] **Castellano M, Glorioso N, Cusi D, Sarzani R, Fabris B, Opocher G, et al.** "Genetic polymorphism of the renin-angiotensin-aldosterone system and arterial hypertension in the Italian population: the GENIPER Project". *J Hypertens*. 2003; 21: 1853-60.
- [307] **Vasku A, Soucek M, Znojil V, Rihacek I, Tschoplova S, Strelcova L, et al.** "Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen gene interaction and prediction of essential hypertension". *Kidney Int*. 1998; 53: 1479-82.

- [308] **Tiret L, Blanc H, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, et al.** "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.
- [309] **Agachan B, Isbir T, Yilmaz H and 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: 545-9.
- [310] **Kario K, Hoshida S, Umeda Y, Sato Y, Ikeda U, Nishiuma S, et al.** "Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genotypes, and day and night blood pressures in elderly Japanese hypertensives". *Hypertens Res*. 1999; 22: 95-103.
- [311] **Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, Gonzalez D, Coca A, et al.** "Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension". *Hypertension*. 2000; 35: 512-7.
- [312] **Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, et al.** "The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk". *J Hypertens*. 1997; 15: 1579-92.
- [313] **Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG and Tybjaerg-Hansen A.** "ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 484-92.
- [314] **Agarwal A, Williams GH and Fisher ND.** "Genetics of human hypertension". *Trends Endocrinol Metab*. 2005; 16: 127-33.
- [315] **Sayed-Tabatabaei FA, Houwing-Duistermaat JJ, van Duijn CM and Witteman JC.** "Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis". *Stroke*. 2003; 34: 1634-9.
- [316] "Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction". *Nature*. 1992.
- [317] **Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L, et al.** "Large-scale test of hypothesised 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: 434-42.
- [318] **Kitsios G and Zintzaras E.** "Genetic variation associated with ischemic heart failure: a HuGE review and meta-analysis". *Am J Epidemiol*. 2007; 166: 619-33.
- [319] **Sharma P.** "Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998; 64: 227-30.
- [320] **Maeda Y, Ikeda U, Ebata H, Hojo Y, Seino Y, Hayashi Y, et al.** "Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertensive individuals with parental history of stroke". *Stroke*. 1996; 27: 1521-3.
- [321] **Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ, Hennekens CH and Lindpaintner K.** "Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke". *Circulation*. 1999; 99: 340-3.
- [322] **Ng DP, Tai BC, Koh D, Tan KW and 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: 1008-16.
- [323] **Boright AP, Paterson AD, Mirea L, Bull SB, Mowjoodi A, Scherer SW, et al.** "Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC Genetics Study". *Diabetes*. 2005; 54: 1238-44.
- [324] **Pereira TV, Nunes AC, Rudnicki M, Magistroni R, Albertazzi A, Pereira AC, et al.** "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; 21: 3155-63.

- [325] **Zhou TB, Qin YH, Su LN, Lei FY, Huang WF, Zhao YJ, et al.** "The association between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene variant and risk of focal segmental glomerulosclerosis: a systematic review and meta-analysis". *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011; 12: 624-33.
- [326] **Qin YH, Zhou TB, Su LN, Lei FY, Huang WF and Zhao YJ.** "Association between ACE polymorphism and risk of IgA nephropathy: a meta-analysis". *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011; 12: 215-23.
- [327] **Ng DP, Tai BC and 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; 57: 2541-6.
- [328] **Zhou TB, Ou C, Qin YH, Su LN, Lei FY, Huang WF, et al.** "Association of angiotensin converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism with idiopathic nephrotic syndrome susceptibility in children: a meta-analysis". *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011; 12: 601-10.
- [329] **Scharplatz M, Puhana MA, Steurer J, Perna A and Bachmann LM.** "Does the Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion polymorphism modify the response to ACE inhibitor therapy?--A systematic review". *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2005; 6: 16.
- [330] **Ruggenenti P, Bettinaglio P, Pinares F and Remuzzi G.** "Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and renoprotection in diabetic and nondiabetic nephropathies". *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3: 1511-25.
- [331] **Kehoe PG, Russ C, McIlroy S, Williams H, Holmans P, Holmes C, et al.** "Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease". *Nat Genet.* 1999; 21: 71-2.
- [332] **Kehoe PG, Katzov H, Andreasen N, Gatz M, Wilcock GK, Cairns NJ, et al.** "Common variants of ACE contribute to variable age-at-onset of Alzheimer's disease". *Hum Genet.* 2004; 114: 478-83.
- [333] **Gayagay G, Yu B, Hambly B, Boston T, Hahn A, Celermajer DS, et al.** "Elite endurance athletes and the ACE I allele--the role of genes in athletic performance". *Hum Genet.* 1998; 103: 48-50.
- [334] **Woods DR, World M, Rayson MP, Williams AG, Jubb M, Jamshidi Y, et al.** "Endurance enhancement related to the human angiotensin I-converting enzyme I-D polymorphism is not due to differences in the cardiorespiratory response to training". *Eur J Appl Physiol.* 2002; 86: 240-4.
- [335] **Alvarez R, Terrados N, Ortolano R, Iglesias-Cubero G, Reguero JR, Batalla A, et al.** "Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance". *Eur J Appl Physiol.* 2000; 82: 117-20.
- [336] **Woods D, Hickman M, Jamshidi Y, Brull D, Vassiliou V, Jones A, et al.** "Elite swimmers and the D allele of the ACE I/D polymorphism". *Hum Genet.* 2001; 108: 230-2.
- [337] **Myerson S, Hemingway H, Budget R, Martin J, Humphries S and Montgomery H.** "Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance". *J Appl Physiol (1985).* 1999; 87: 1313-6.
- [338] **Nazarov IB, Woods DR, Montgomery HE, Shneider OV, Kazakov VI, Tomilin NV, et al.** "The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes". *Eur J Hum Genet.* 2001; 9: 797-801.
- [339] **Tsianos G, Sanders J, Dhamrait S, Humphries S, Grant S and Montgomery H.** "The ACE gene insertion/deletion polymorphism and elite endurance swimming". *Eur J Appl Physiol.* 2004; 92: 360-2.
- [340] **Arias-Vasquez A, Sayed-Tabatabaei FA, Schut AF, Hofman A, Bertolli-Avella AM, Vergeer JM, et al.** "Angiotensin converting enzyme gene, smoking and mortality in a population-based study". *Eur J Clin Invest.* 2005; 35: 444-9.
- [341] **Hooper NM and Turner AJ.** "Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Aminopeptidase P is anchored by a glycosyl-phosphatidylinositol moiety". *FEBS Lett.* 1988; 229: 340-4.

- [342] **Ryan JW, Papapetropoulos A, Ju H, Denslow ND, Antonov A, Virmani R, et al.** "Aminopeptidase P is disposed on human endothelial cells". *Immunopharmacology*. 1996; 32: 149-52.
- [343] **Decarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R and Adam A.** "Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat". *Am J Physiol*. 1996; 271: H1340-7.
- [344] **Skidgel RA.** "Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity". *Trends Pharmacol Sci*. 1988; 9: 299-304.
- [345] **Sigler C, Annis K, Cooper K, Haber H and Van dS.** "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.
- [346] **Kerr MA and Kenny AJ.** "The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border". *Biochem J*. 1974; 137: 477-88.
- [347] **Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC and Beaumont A.** "Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology". *Pharmacol Rev*. 1993; 45: 87-146.
- [348] **Takaki Y, Iwata N, Tsubuki S, Taniguchi S, Toyoshima S, Lu B, et al.** "Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain". *J Biochem*. 2000; 128: 897-902.
- [349] **Gafford JT, Skidgel RA, Erdos EG and Hersh LB.** "Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides". *Biochemistry*. 1983; 22: 3265-71.
- [350] **Dumoulin MJ, Adam A, Blais C, Jr. and Lamontagne D.** "Metabolism of bradykinin by the rat coronary vascular bed". *Cardiovasc Res*. 1998; 38: 229-36.
- [351] **Graf K, Grafe M, Bossaller C, Niehus J, Schulz KD, Auch-Schwelk W, et al.** "Degradation of bradykinin by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in cultured human endothelial cells". *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1993; 31: 267-72.
- [352] **Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D and Levy E.** "Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial". *Am J Hypertens*. 2004; 17: 103-11.
- [353] **Russell JS, Chi H, Lantry LE, Stephens RE and Ward PE.** "Substance P and neurokinin A metabolism by cultured human skeletal muscle myocytes and fibroblasts". *Peptides*. 1996; 17: 1397-403.
- [354] **Abbott CA, Baker E, Sutherland GR and McCaughan GW.** "Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene". *Immunogenetics*. 1994; 40: 331-8.
- [355] **Kopp UC, Farley DM and Smith LA.** "Bradykinin-mediated activation of renal sensory neurons due to prostaglandin-dependent release of substance P". *Am J Physiol*. 1997; 272: R2009-R16.
- [356] **Campos MM and Calixto JB.** "Neurokinin mediation of edema and inflammation". *Neuropeptides*. 2000; 34: 314-22.
- [357] **Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S and De M, I.** "Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV". *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003; 40: 209-94.
- [358] **Cumming SA, Halsall DJ, Ewan PW and 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.
- [359] **Ensembl.** "Allele Frequency Data for SNP rs4926". Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG00000149131;r=11:57597518-57614853;t=ENST00000278407;v=rs4926;vdb=variation;vf=101154276

- [360] **Emonts M, de Jongh CE, Houwing-Duistermaat JJ, van Leeuwen WB, de Groot R, Verbrugh HA, et al.** "Association between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the human complement cascade activator serine protease C1 inhibitor (C1INH) valine vs. methionine polymorphism at amino acid position 480". *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 50: 330-2.
- [361] **Lu F, Zhao P, Fan Y, Tang S, Hu J, Liu X, et al.** "An association study of SERPING1 gene and age-related macular degeneration in a Han Chinese population". *Mol Vis*. 2010; 16: 1-6.
- [362] **Park KH, Ryu E, Tosakulwong N, Wu Y and Edwards AO.** "Common variation in the SERPING1 gene is not associated with age-related macular degeneration in two independent groups of subjects". *Mol Vis*. 2009; 15: 200-7.
- [363] **Emonts M, Hazes MJ, Houwing-Duistermaat JJ, van der Gaast-de Jongh CE, de Vogel L, Han HK, et al.** "Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study". *BMC Med Genet*. 2011; 12: 36.
- [364] **Passey C, Birnbaum AK, Brundage RC, Oetting WS, Israni AK and Jacobson PA.** "Dosing equation for tacrolimus using genetic variants and clinical factors". *Br J Clin Pharmacol*. 2011; 72: 948-57.
- [365] **Freiberger T, Grombirikova H, Ravcukova B, Jarkovsky J, Kuklinek P, Krystufkova O, et al.** "No evidence for linkage between the hereditary angioedema clinical phenotype and the BDKR1, BDKR2, ACE or MBL2 gene". *Scand J Immunol*. 2011; 74: 100-6.
- [366] **Lung CC, Chan EK and Zuraw BL.** "Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency". *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99: 134-46.
- [367] **Freiberger T, Vyskocilova M, Kolarova L, Kuklinek P, Krystufkova O, Lahodna M, et al.** "Exon 1 polymorphism of the B2BKR gene does not influence the clinical status of patients with hereditary angioedema". *Hum Immunol*. 2002; 63: 492-4.
- [368] **Blasko B, Szeplaki G, Varga L, Ronai Z, Prohaszka Z, Sasvari-Szekely M, et al.** "Relationship between copy number of genes (C4A, C4B) encoding the fourth component of complement and the clinical course of hereditary angioedema (HAE)". *Mol Immunol*. 2007; 44: 2667-74.
- [369] **Xu YY, Zhi YX, Yin J, Wang LL, Wen LP, Gu JQ, et al.** "Mutational spectrum and genotype-phenotype correlation in Chinese families with hereditary angioedema". *Allergy*. 2012; 67: 1430-6.
- [370] **Zito F, Drummond F, Bujac SR, Esnouf MP, Morrissey JH, Humphries SE, et al.** "Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men". *Circulation*. 2000; 102: 2058-62.
- [371] **Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, et al.** "Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels". *Am J Hum Genet*. 1992; 51: 197-205.
- [372] **Farkas H, Varga L, Szeplaki G, Visy B, Harmat G and Bowen T.** "Management of hereditary angioedema in pediatric patients". *Pediatrics*. 2007; 120: e713-22.
- [373] **Zanichelli A, Arcoleo F, Barca MP, Borrelli P, Bova M, Cancian M, et al.** "A nationwide survey of hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency in Italy". *Orphanet J Rare Dis*. 2015; 10: 11.
- [374] **Ελληνική Στατιστική Αρχή.** "Απογραφή Πληθυσμού-Κατοικιών 2011"; Available from: <http://www.statistics.gr/2011-census-pop-hous>
- [375] **Bork K, Staubach P, Eckardt AJ and Hardt J.** "Symptoms, course, and complications of abdominal attacks in hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency". *Am J Gastroenterol*. 2006; 101: 619-27.
- [376] **Farkas H.** "Pediatric hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency". *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010; 6: 18.

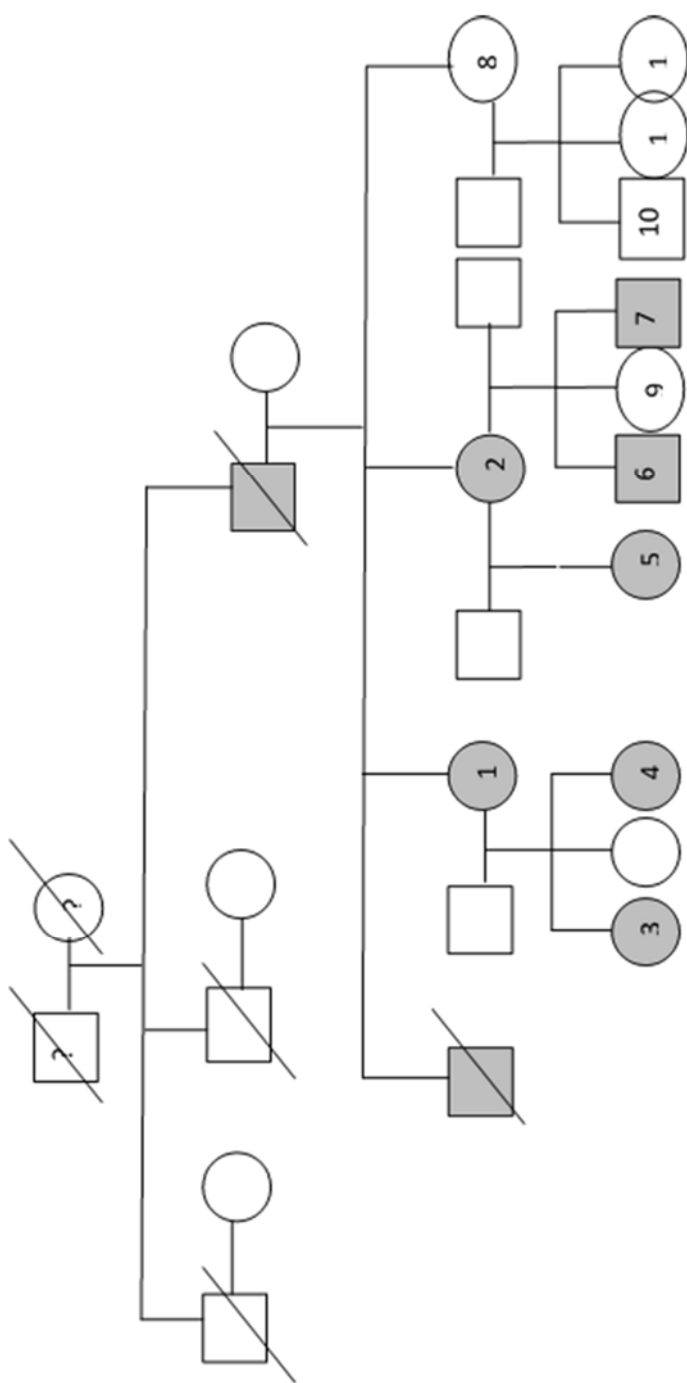
- [377] **Riedl M, Gower RG and Chrvala CA.** "Current medical management of hereditary angioedema: results from a large survey of US physicians". *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011; 106: 316-22.e4.
- [378] **Bork K, Hardt J and Witzke G.** "Fatal laryngeal attacks and mortality in hereditary angioedema due to C1-INH deficiency". *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130: 692-7.
- [379] **Gompels MM, Lock RJ, Abinun M, Bethune CA, Davies G, Grattan C, et al.** "C1 inhibitor deficiency: consensus document". *Clin Exp Immunol.* 2005; 139: 379-94.
- [380] **Bouillet L, Longhurst H, Boccon-Gibod I, Bork K, Bucher C, Bygum A, et al.** "Disease expression in women with hereditary angioedema". *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199: 484.e1-4.
- [381] **Bork K, Fischer B and Dewald G.** "Recurrent episodes of skin angioedema and severe attacks of abdominal pain induced by oral contraceptives or hormone replacement therapy". *Am J Med.* 2003; 114: 294-8.
- [382] **McGlinchey PG and McCluskey DR.** "Hereditary angioedema precipitated by estrogen replacement therapy in a menopausal woman". *Am J Med Sci.* 2000; 320: 212-3.
- [383] **Longhurst HJ, Farkas H, Craig T, Aygoren-Pursun E, Bethune C, Bjorkander J, et al.** "HAE international home therapy consensus document". *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2010; 6: 22.
- [384] **Cardarelli W.** "Managed care implications of hereditary angioedema". *Am J Manag Care.* 2013; 19: s119-24.
- [385] **Poon E, Seed PT, Greaves MW and Kobza-Black A.** "The extent and nature of disability in different urticarial conditions". *Br J Dermatol.* 1999; 140: 667-71.
- [386] **Nordenfelt P, Dawson S, Wahlgren CF, Lindfors A, Mallbris L and Bjorkander J.** "Quantifying the burden of disease and perceived health state in patients with hereditary angioedema in Sweden". *Allergy Asthma Proc.* 2014; 35: 185-90.
- [387] **Bouillet L, Launay D, Fain O, Boccon-Gibod I, Laurent J, Martin L, et al.** "Hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency: clinical presentation and quality of life of 193 French patients". *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013; 111: 290-4.
- [388] **Gomide MA, Toledo E, Valle SO, Campos RA, Franca AT, Gomez NP, et al.** "Hereditary angioedema: quality of life in Brazilian patients". *Clinics (Sao Paulo).* 2013; 68: 81-3.
- [389] **Aabom A, Andersen KE, Perez-Fernandez E, Caballero T and Bygum A.** "Health-related quality of life in Danish patients with hereditary angioedema". *Acta Derm Venereol.* 2015; 95: 225-6.
- [390] **Prior N, Remor E, Gomez-Traseira C, Lopez-Serrano C, Cabanas R, Contreras J, et al.** "Development of a disease-specific quality of life questionnaire for adult patients with hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency (HAE-QoL): Spanish multi-centre research project". *Health Qual Life Outcomes.* 2012; 10: 82.
- [391] **Cicardi M, Craig TJ, Martinez-Saguer I, Hebert J and Longhurst HJ.** "Review of recent guidelines and consensus statements on hereditary angioedema therapy with focus on self-administration". *Int Arch Allergy Immunol.* 2013; 161 Suppl 1: 3-9.
- [392] **Craig T, Aygoren-Pursun E, Bork K, Bowen T, Boysen H, Farkas H, et al.** "WAO Guideline for the Management of Hereditary Angioedema". *World Allergy Organ J.* 2012; 5: 182-99.
- [393] **Kaplan AP, Joseph K and Silverberg M.** "Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease". *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109: 195-209.
- [394] **Speletas M, Szilagyi A, Csuka D, Koutsostathis N, Psarros F, Moldovan D, et al.** "F12-46C/T polymorphism as modifier of the clinical phenotype of hereditary angioedema". *Allergy.* 2015.
- [395] **Barilla-LaBarca ML, Gioffre D, Zanichelli A, Cicardi M and Atkinson JP.** "Acquired C1 esterase inhibitor deficiency in two patients presenting with a lupus-like syndrome and anticardiolipin antibodies". *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 223-6.
- [396] **Bjorkqvist J, de Maat S, Lewandrowski U, Di Gennaro A, Oschatz C, Schonig K, et al.** "Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III". *J Clin Invest.* 2015; 125: 3132-46.

- [397] **Gailani D, Bane CE and Gruber A.** "Factor XI and contact activation as targets for antithrombotic therapy". *J Thromb Haemost.* 2015.
- [398] **Muller F, Gailani D and Renne T.** "Factor XI and XII as antithrombotic targets". *Curr Opin Hematol.* 2011; 18: 349-55.

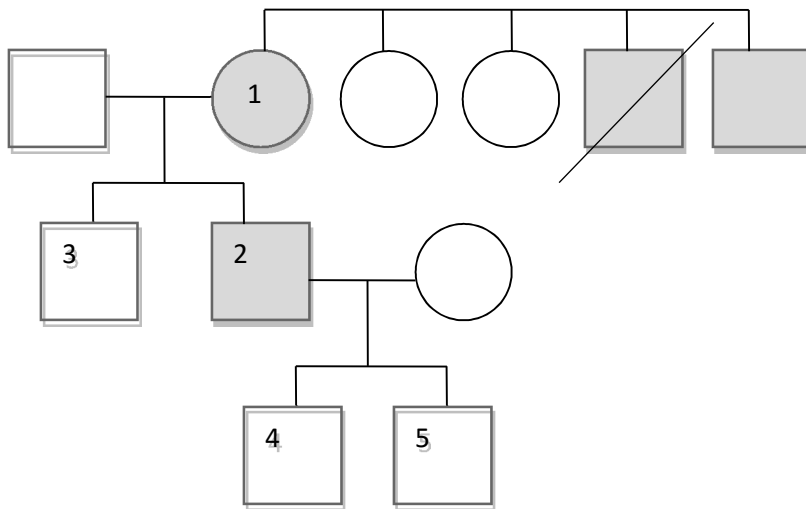
Παράρτημα Ι

Τα γενεαλογικά δέντρα των Ελληνικών οικογενειών με ΚΑΟ*

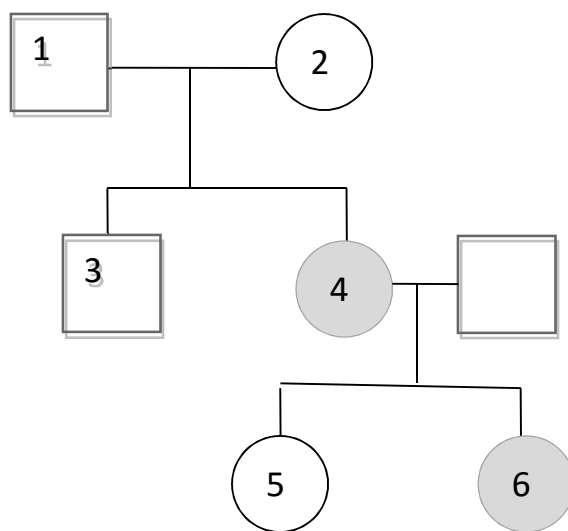
** με γκρι γραμμοσκίαση σημειώνονται οι ασθενείς με ΚΑΟ*



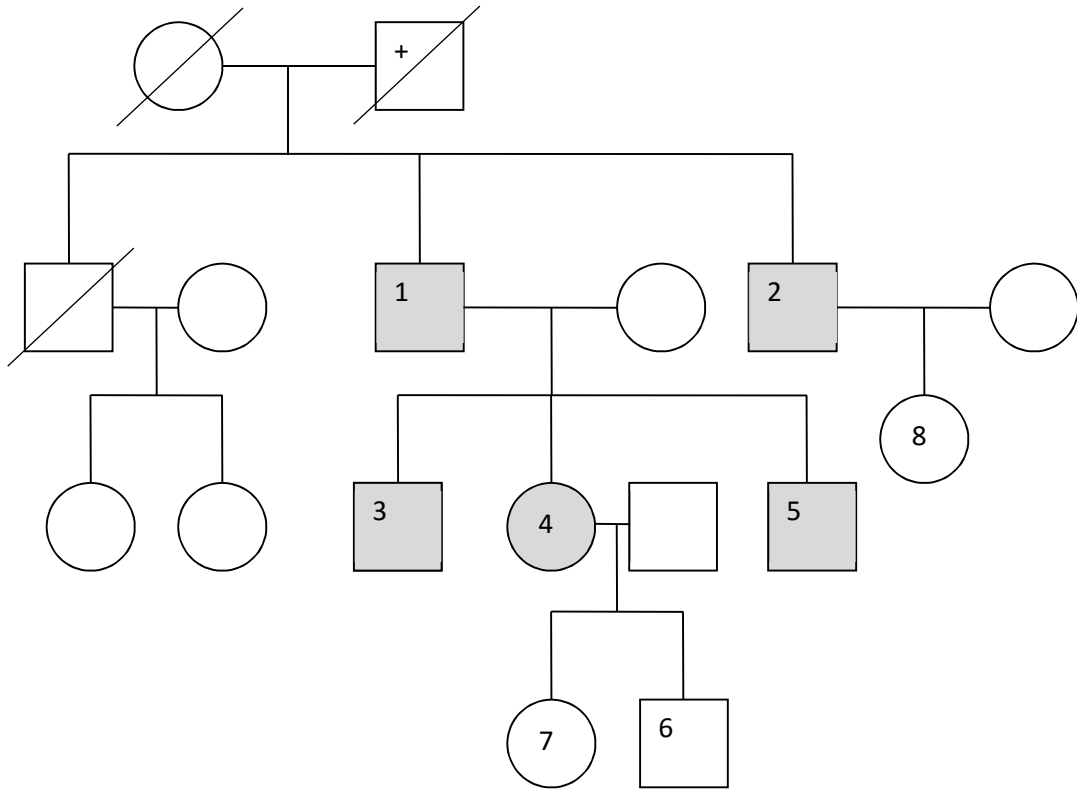
Οικογένεια 01. HAE I [Μετάλλαξη: c.1A>G, p.M1V]



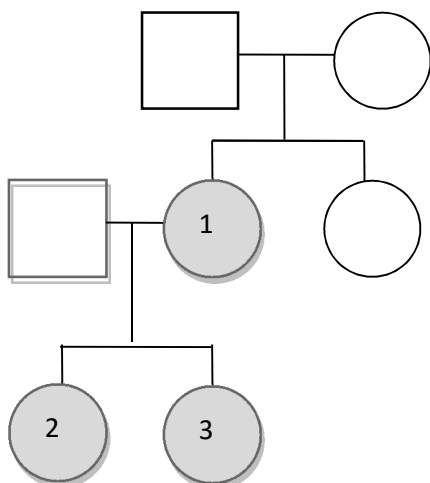
Οικογένεια 02. HAE I [Μετάλλαξη: g.1769G>A, c.1A>C, M1L]



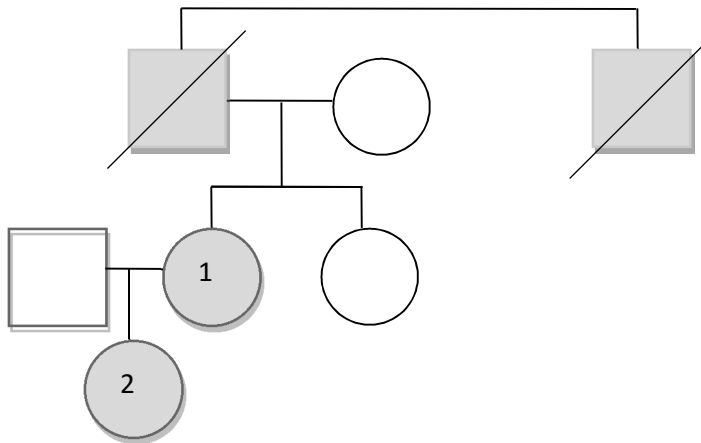
Οικογένεια 03. HAE I [Μετάλλαξη: g.3565C>G, c.239C>G, A80G]



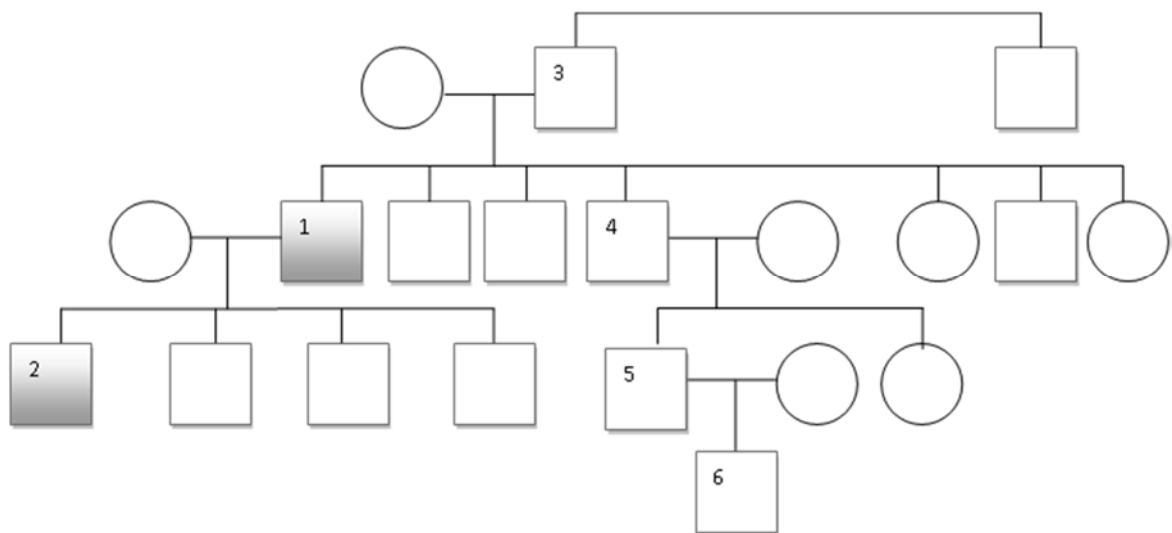
Οικογένεια 04. HAE I [Μετάλλαξη: g.3673delA (frame shift), Q116R-V147X[31aa]]



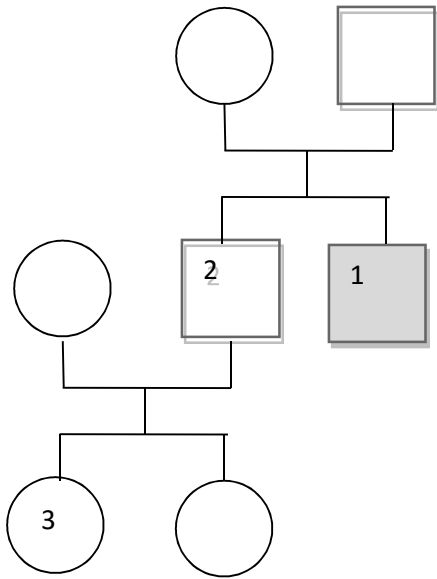
Οικογένεια 05. HAE I [Μετάλλαξη: g.3826T>A, c.500T>A, M167K]



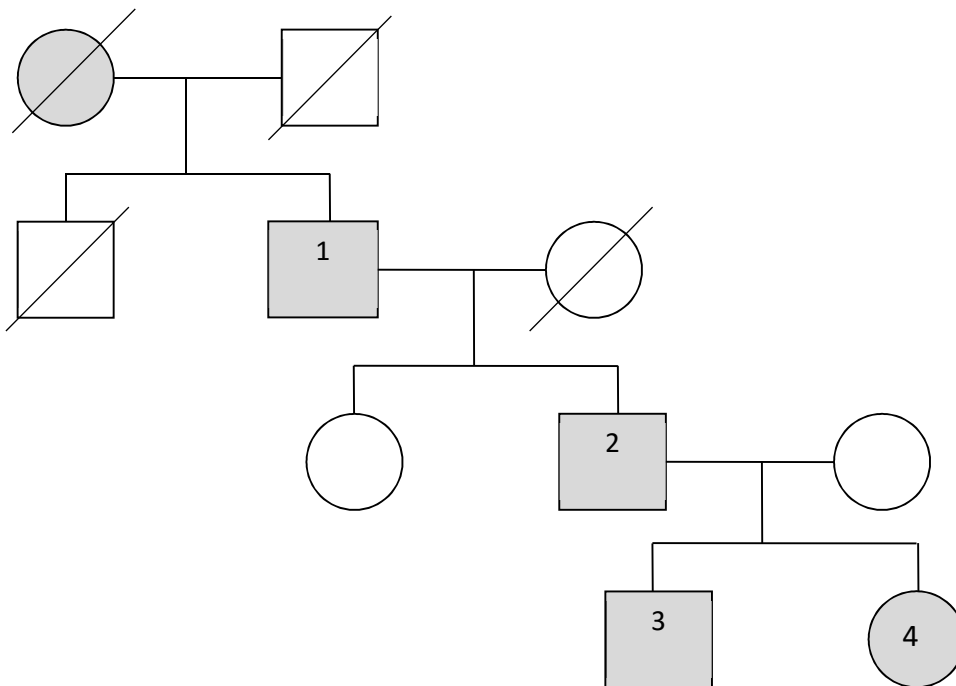
Οικογένεια 06. HAE I [Μετάλλαξη: g.3834delT, c.508delT, S170fs]



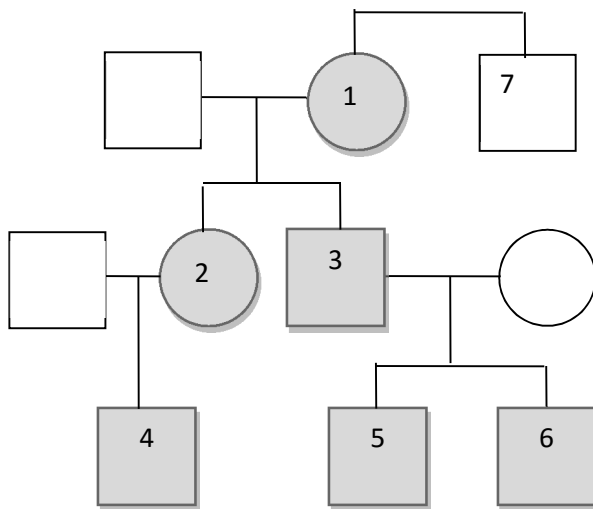
Οικογένεια 07. HAE I [Μετάλλαξη: g.3876>A, c.550G>A, G183R]



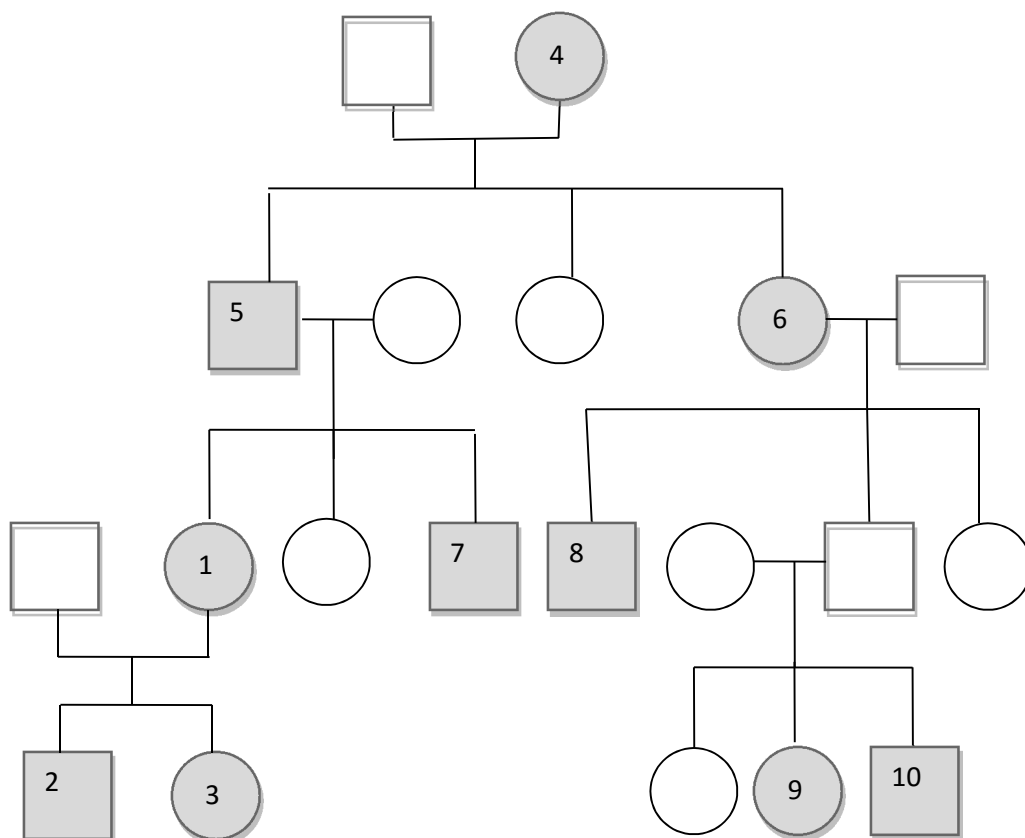
Οικογένεια 08. HAE I [Μετάλλαξη: g.3878T>C, c.550+2T>C]



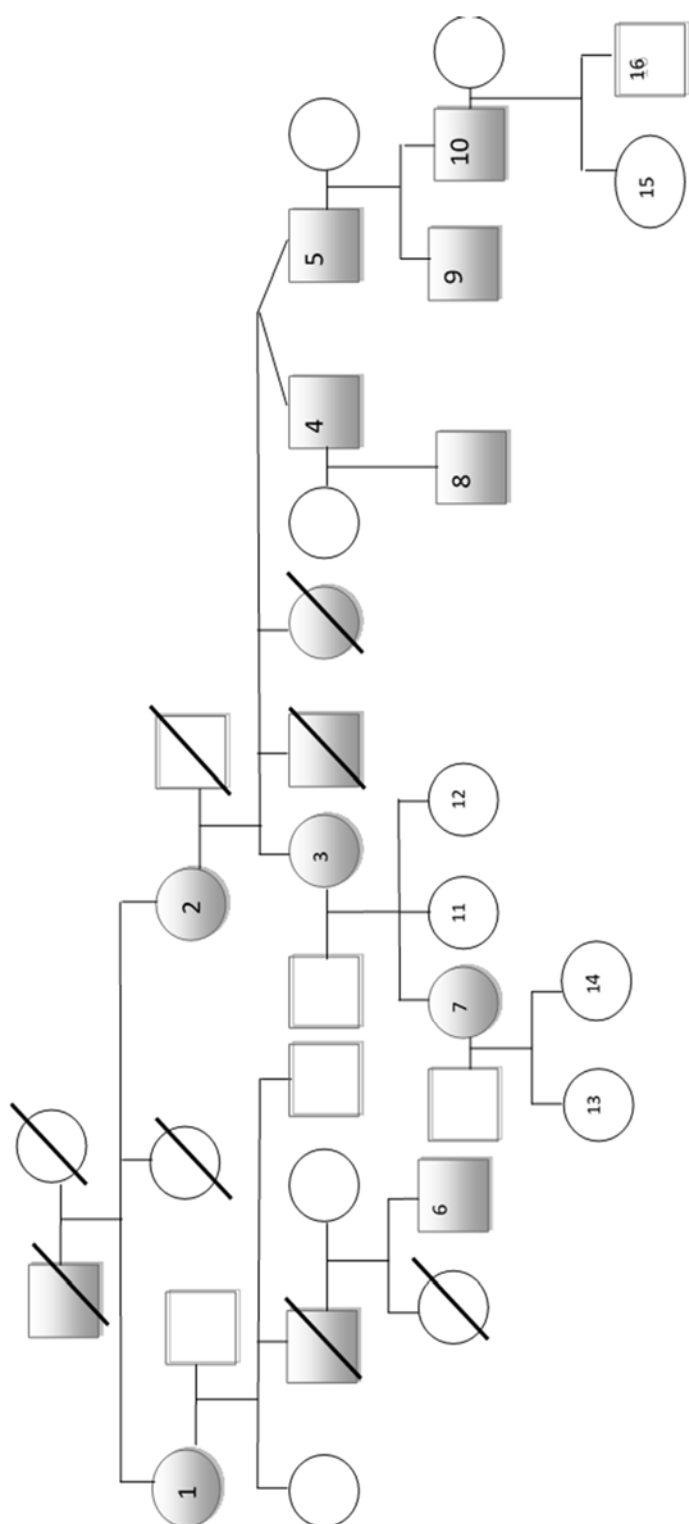
Οικογένεια 9. HAE I [Μετάλλαξη: g.5532G>A (intron 3-exon 4 junction/splicing defect)]



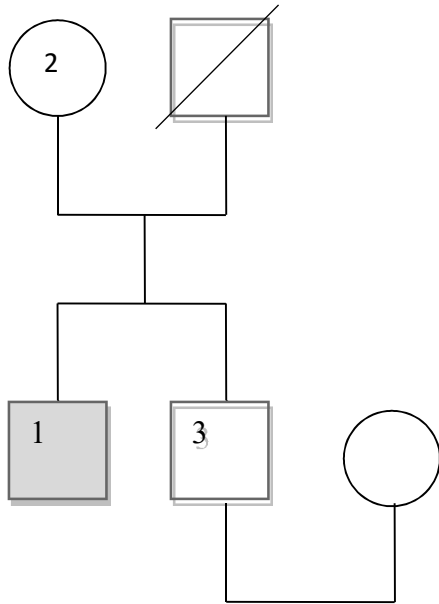
Οικογένεια 10. HAE I [Mutation: g.5568-71DelATCC, c.586-589DelATCC I196fs]



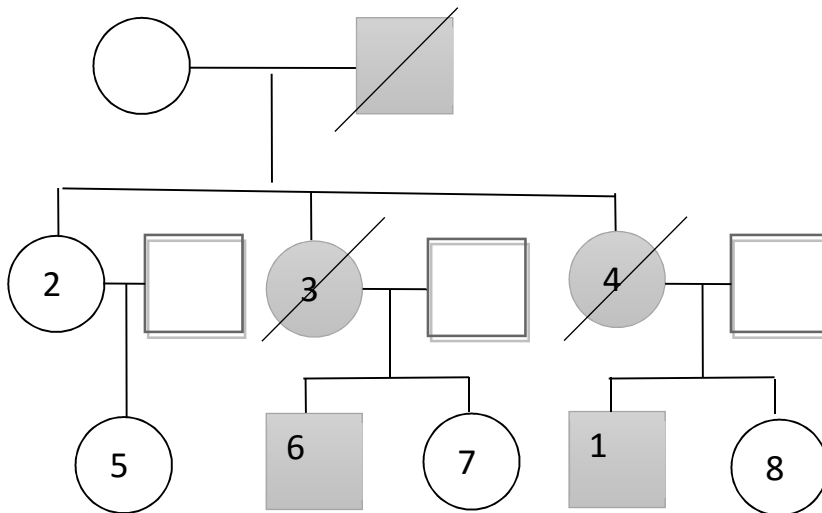
Οικογένεια 11. HAE I [Mutation: g.5583insC, c.600insC, K201fs]



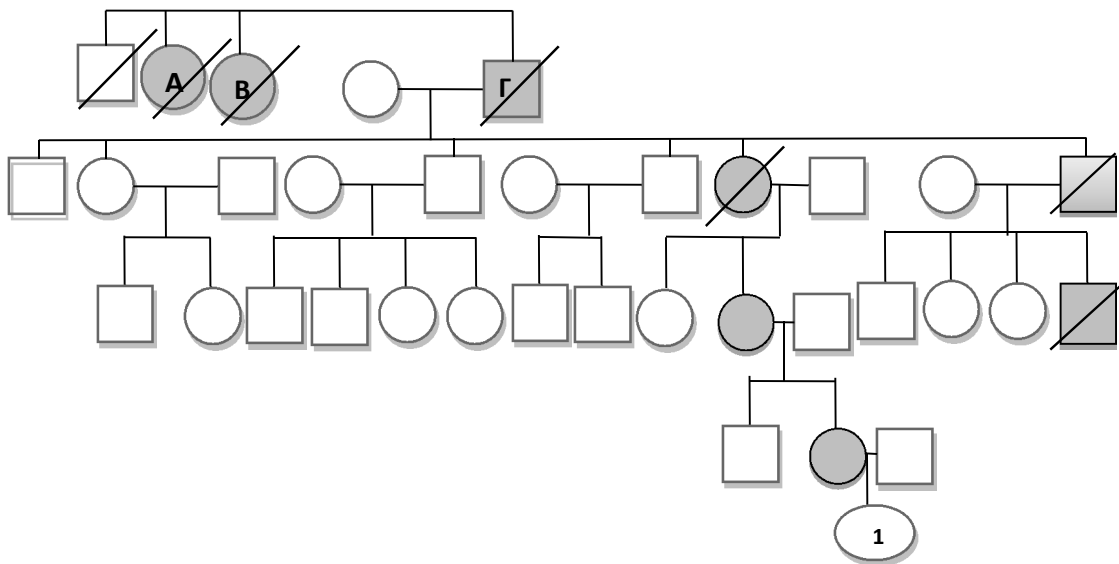
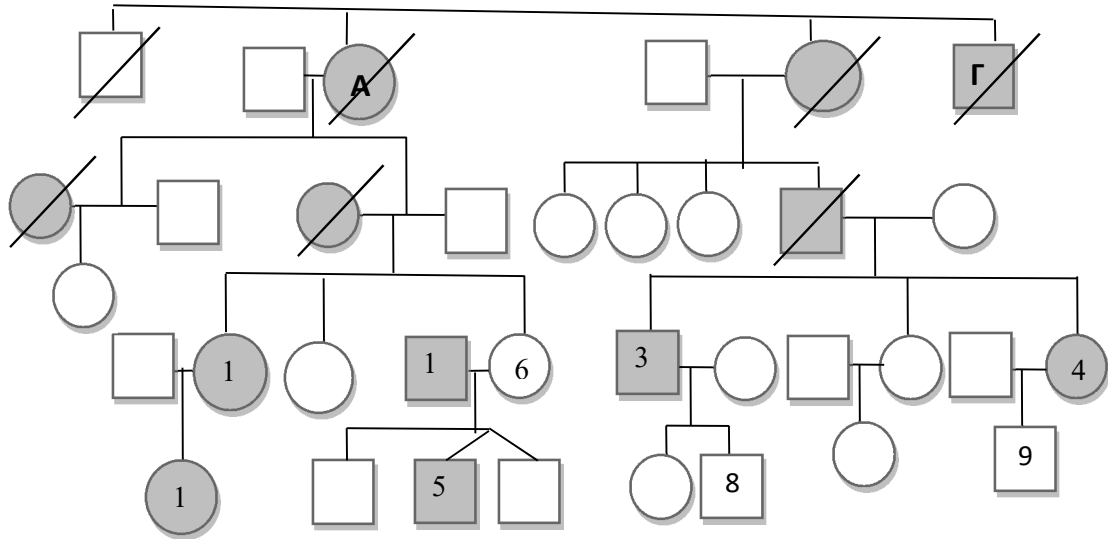
Οικογένεια 12. ΗΑΕ Ι [Μετάλλαξη: g.5655-56TC>AA, c.675-76 TC>AA, F225X - exon 4]



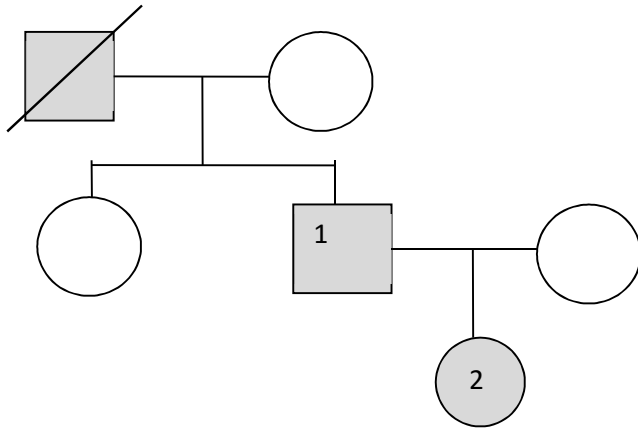
Οικογένεια 13. HAE I [Μετάλλαξη: g.9692A>C, c.871A>C, N291H]



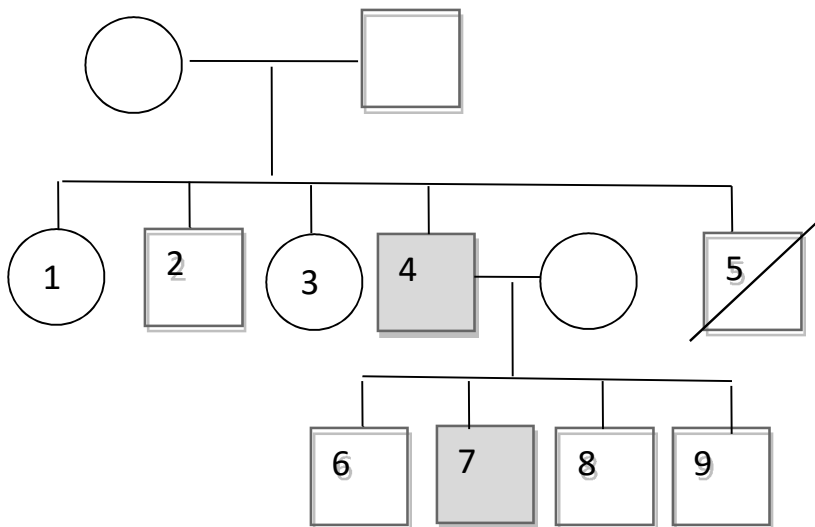
Οικογένεια 14. HAE I [Μετάλλαξη: g.9699T>C, c.878T>C, p.I293T]



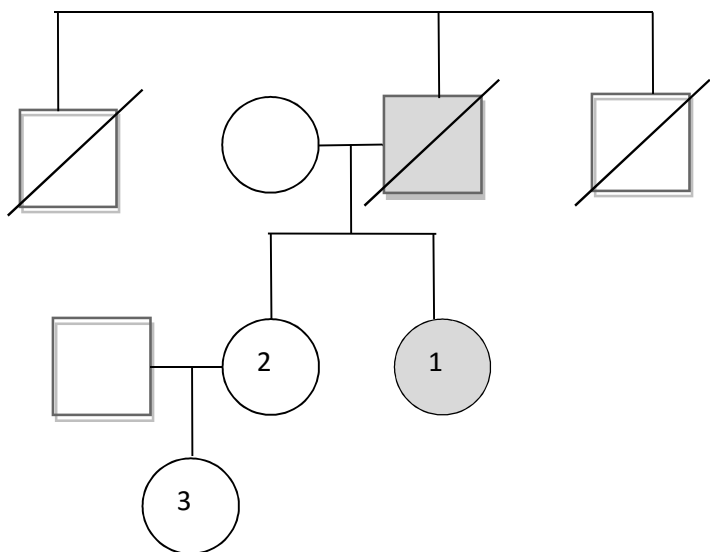
Οικογένεια 15. HAE I [Μετάλλαξη: 9891C>G, c.890-14C>G]



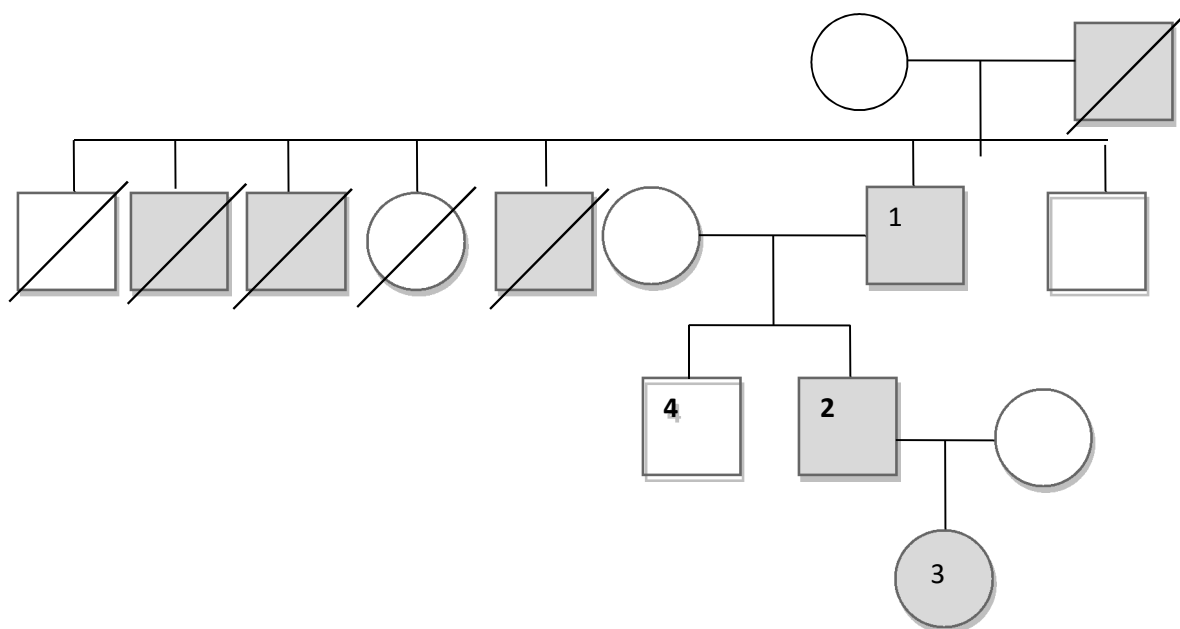
Οικογένεια 16. HAE I [Μετάλλαξη: g.9923T>C, c.908T>C, F303S]



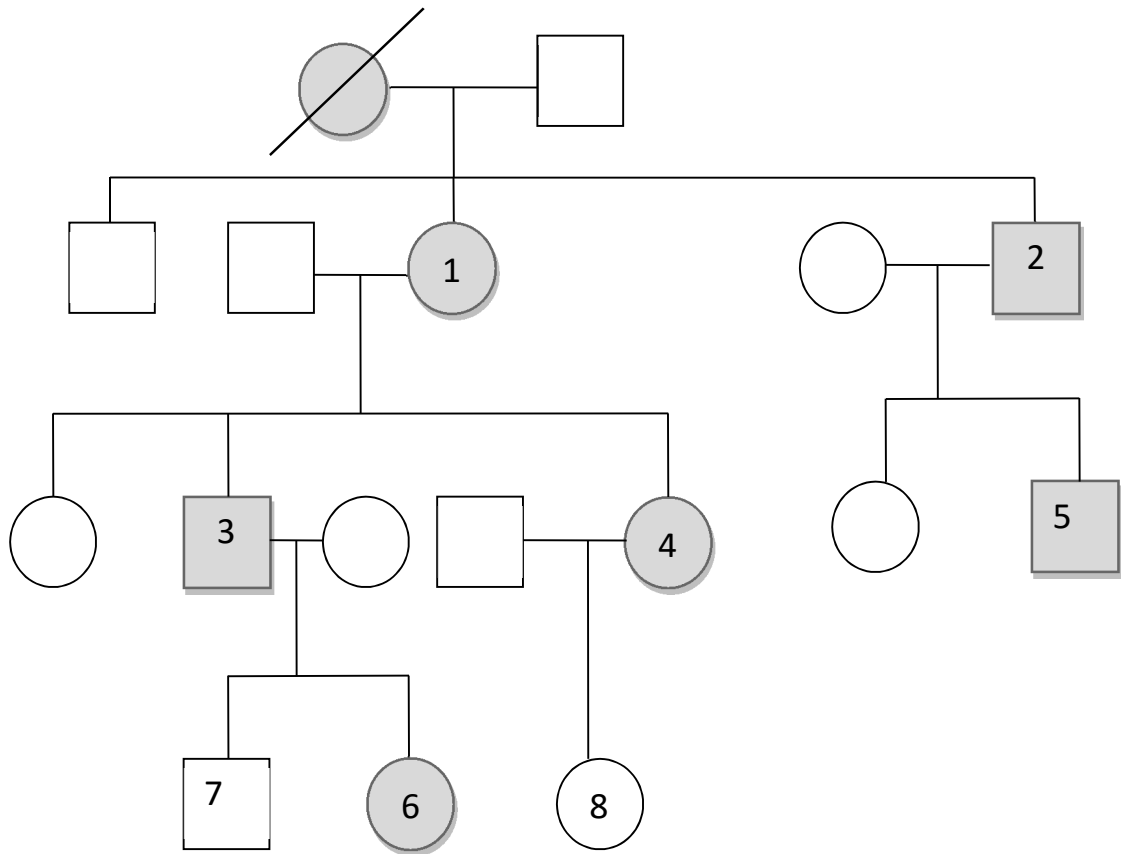
Οικογένεια 17. HAE I [Μετάλλαξη: g.10045G>A, c.1029+1G>A]



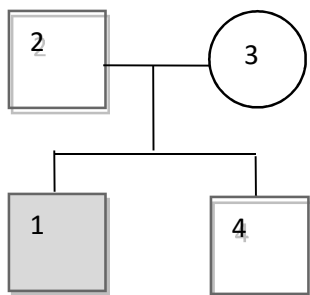
Οικογένεια 18. HAE I [Μετάλλαξη: g.15219C>T, c.1036C>T, Q346X]



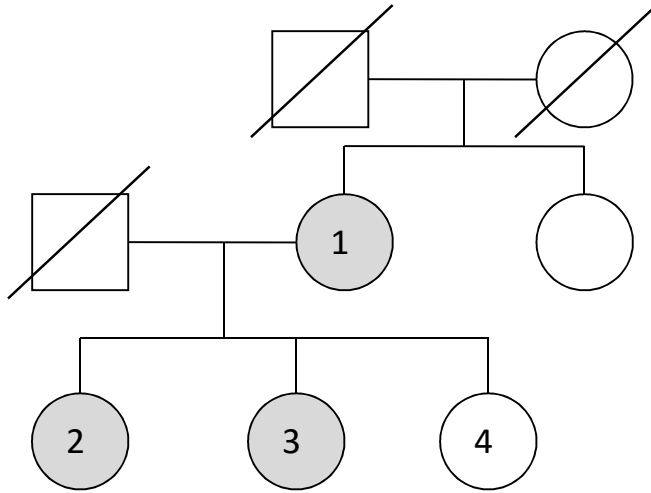
Οικογένεια 19. HAE I [Μετάλλαξη: g.15219-33Del15bp, c.1036-50Del15bp, Del346Q 350S]



Οικογένεια 20. HAE I [Μετάλλαξη: g.15289delA, c.1106delA, D369fs]



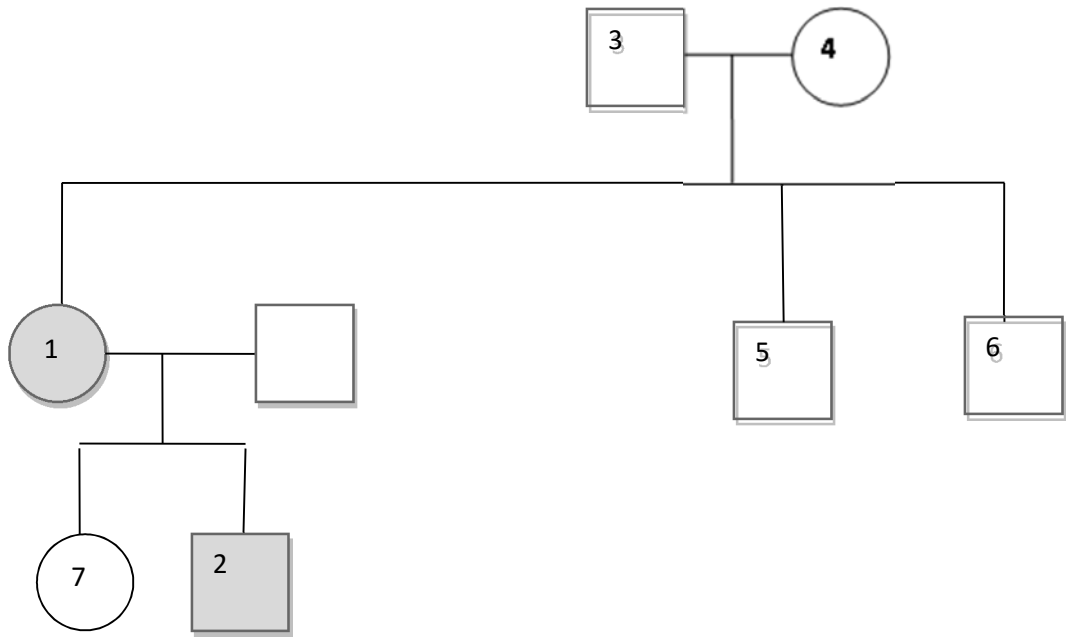
Οικογένεια 21. HAE I [Μετάλλαξη: g.15376T>C, c.1193T>C, Leu398Pro]



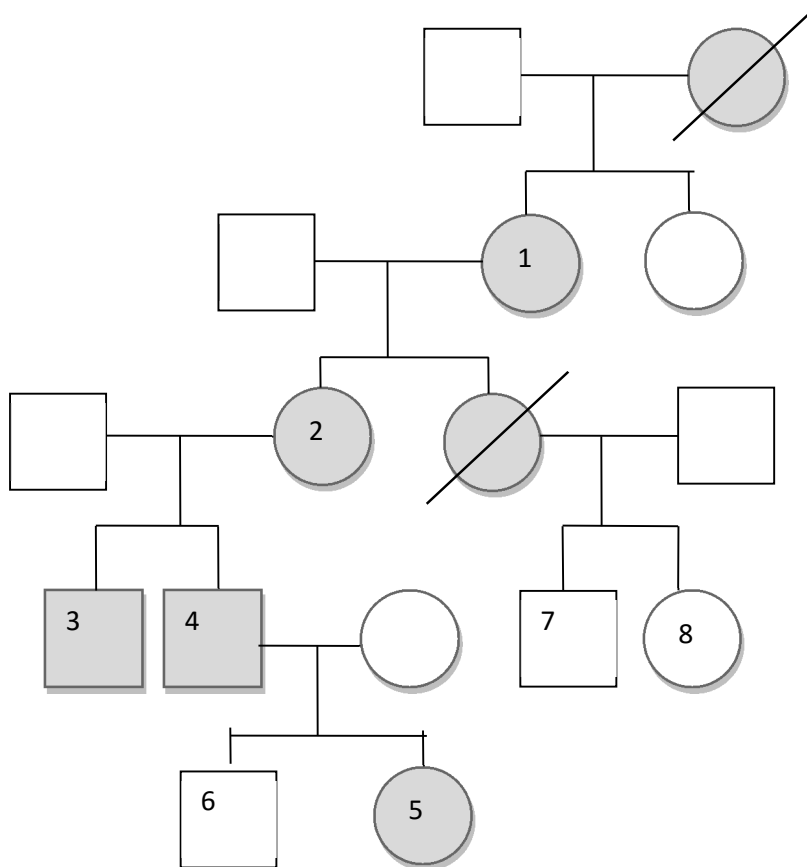
Οικογένεια 22. HAE I [Μετάλλαξη: g.17822A>G – intron 7 – splicing defect]

Οικογένεια 23. HAE I [Μετάλλαξη: g.17925insGAACTGACA_dupl, c.1350insGAACTGACA_dupl, T450fs [E448-L449-T450_duplication]]

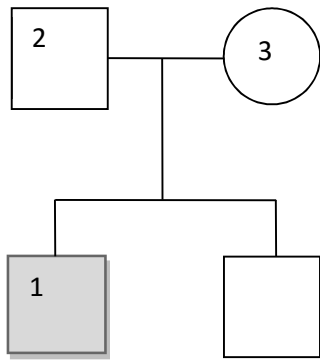
Δεν υπήρξε συνεργασία από τον ένα ασθενή της οικογένειας αυτής για γενετικό έλεγχο.



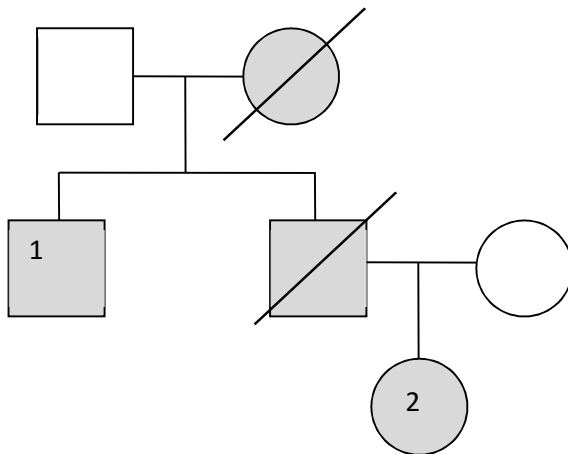
Οικογένεια 24. HAE I [Μετάλλαξη : g.17927-8delGA, c.1353_4delGA, E451fs]



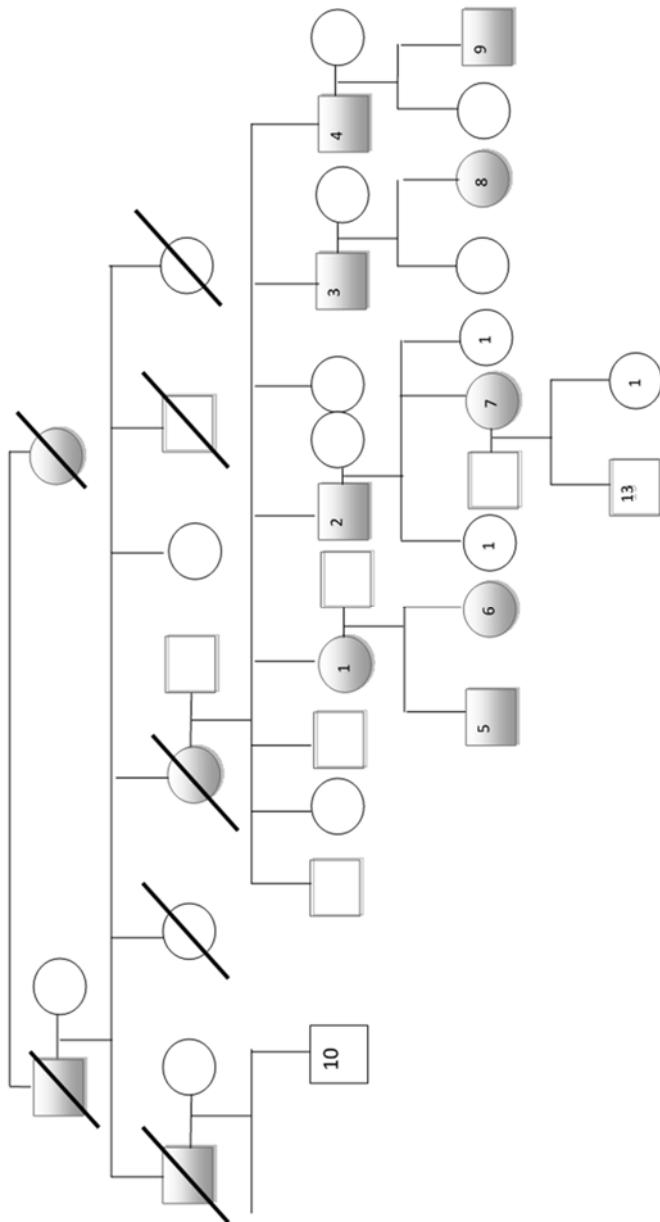
Οικογένεια 25. HAE II [Μετάλλαξη : g.17970C>T, c.1396C>T, R466C]



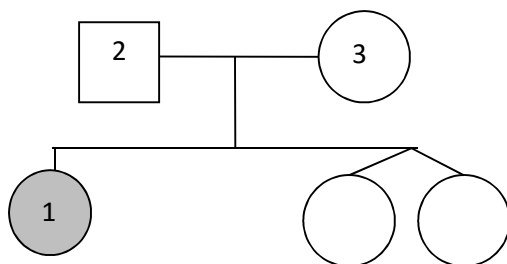
Οικογένεια 26. ΗΑΕ II [Μετάλλαξη: g.17970C>T, c.1396C>T, R466C]



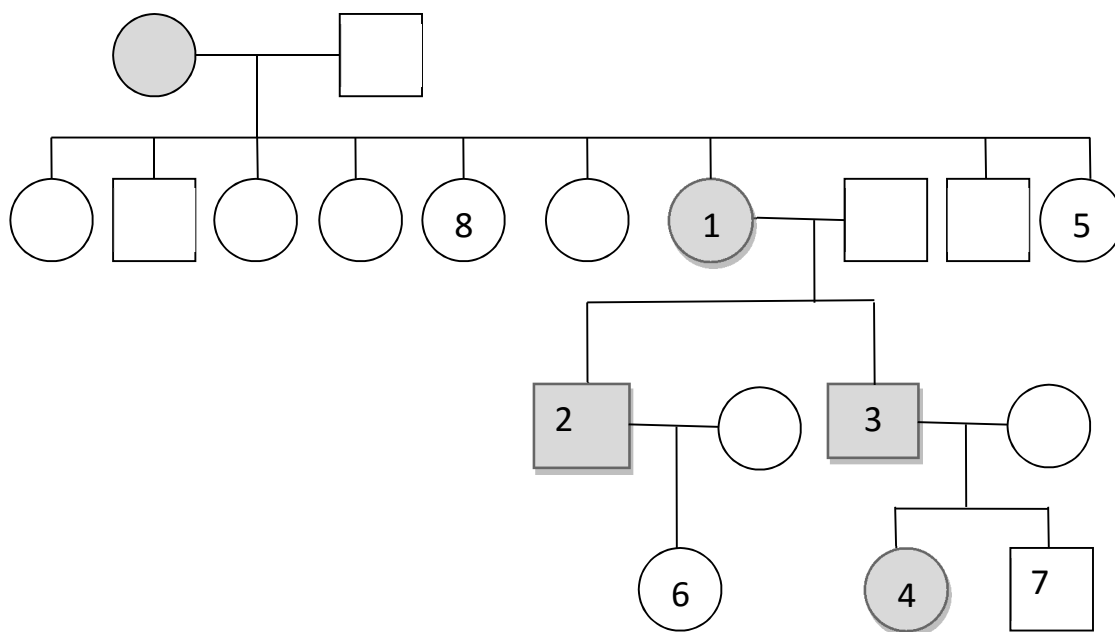
Οικογένεια 27. ΗΑΕ II [Μετάλλαξη: g.17971G>A, c.1397G>A, R466H]



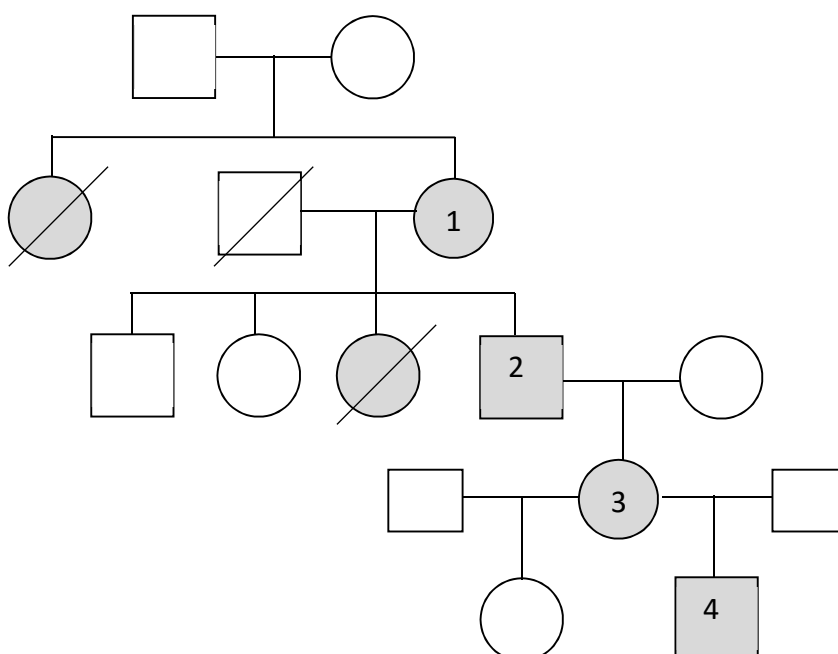
Οικογένεια 28 . ΗΑΕ II [Μετάλλαξη: g.17971G>A, c.1397G>A, R466H]



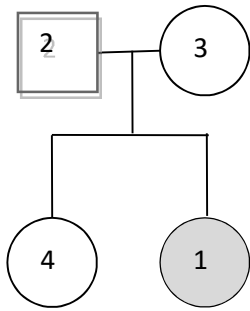
Οικογένεια 29. ΗΑΕ I [Μετάλλαξη: g.17991G>A, c.1417G>A, V473M – EXON 8]



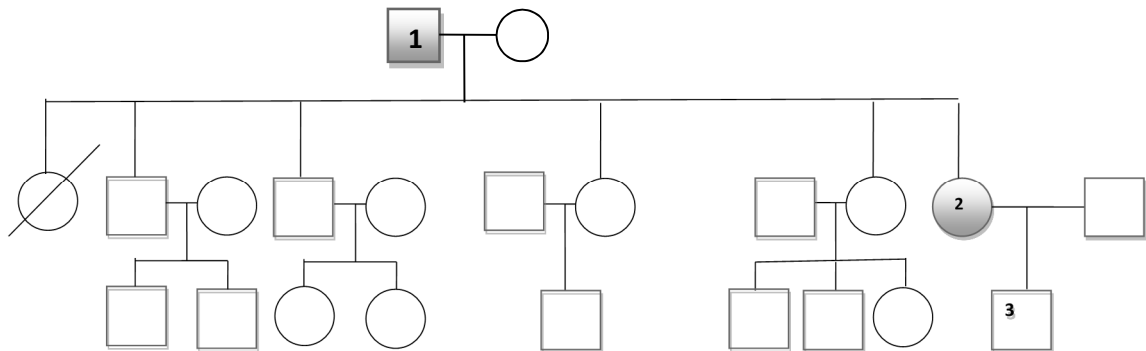
Οικογένεια 30. HAE I [Μετάλλαξη: g.17993C>A, Q474K]



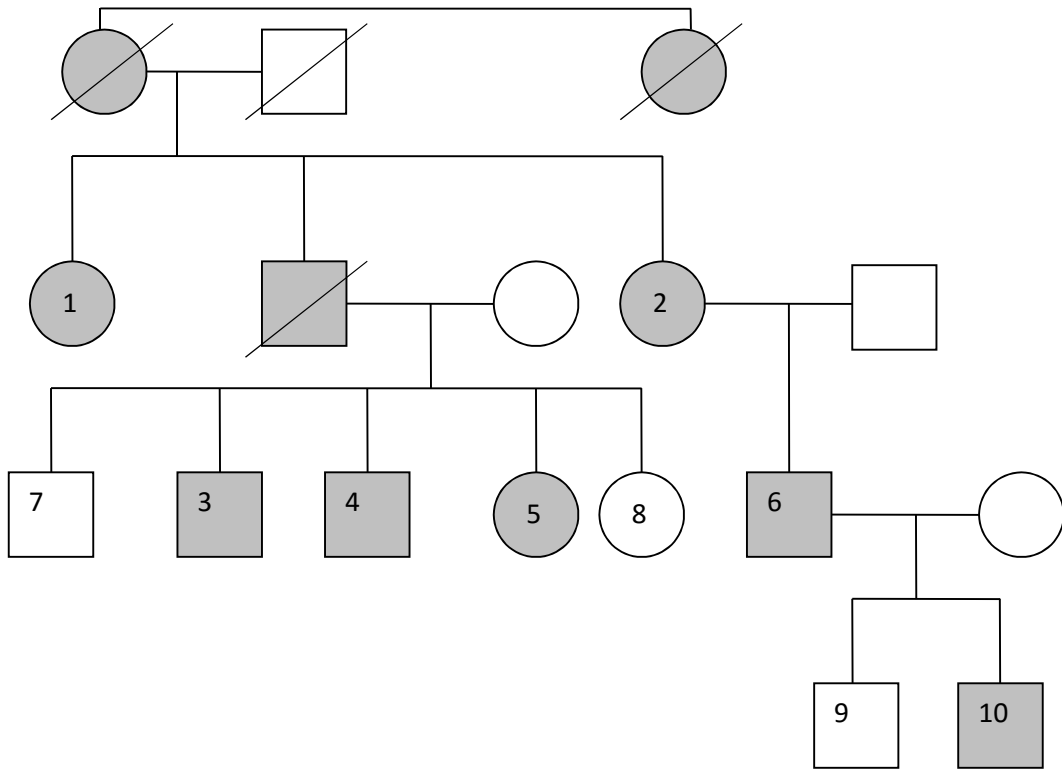
Οικογένεια 31. HAE I [Μετάλλαξη: g.18020G>A, c.1446G>A, W482X]



Οικογένεια 32. HAE I [Μετάλλαξη: g.18077-18083delAGACCTG, c.1503-1503+6delAGACCTG, p.X501fs]



Οικογένεια 33. HAE I [Μετάλλαξη: Large deletion (exons 1-8)]



Οικογένεια 34. HAE I [Μη ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στο *SEPRING1*]
