

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Εμμανουήλ Καναβάκης

Διδακτορική Διατριβή

Παπαποστόλου Γρ. Απόστολος

Νευρολόγος

«Γενετικοί παράγοντες στην παθογένεση των Αγγειακών
Εγκεφαλικών Επεισοδίων»

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἱητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, Ἱστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσιν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὅρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῃητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἕς τὸν αἰεὶ χρόνον. Παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω.

Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου.

Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους.

Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.____

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:10/4/2006

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΚΑΝΑΒΑΚΗΣ, Καθηγητής-Διευθυντής Εργαστηρίου

Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

ΣΟΦΙΑ ΚΙΤΣΙΟΥ-ΤΖΕΛΗ, Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο

Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΠΕΓΓΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

Νευρολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:30/5/14

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΚΑΝΑΒΑΚΗΣ, Καθηγητής-Διευθυντής Εργαστηρίου

Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

ΣΟΦΙΑ ΚΙΤΣΙΟΥ-ΤΖΕΛΗ, Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο

Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΠΕΓΓΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

Νευρολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο

JAN TRAEGER-ΣΥΝΟΔΙΝΟΥ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστημίου Αθηνών

ΜΑΡΙΑ ΤΖΕΤΗ, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο

Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

ΣΟΦΙΑ ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΥ, Λέκτορας Νευρολογίας Πανεπιστημίου

Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΤΣΗΣ, Λέκτορας Νευρολογίας Πανεπιστημίου

Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ:

Μελέτιος Αθανάσιος Δημόπουλος

Καθηγητής Παθολογίας

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες	8
Βιογραφικό σημείωμα.....	10
Περίληψη-Abstract.....	13

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΡΙΣΜΟΣ.....	17
2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	20
2.1 Επιδημιολογία του ισχαιμικού ΑΕΕ.....	20
2.2 Επιδημιολογία της μη τραυματικής ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας.....	22
2.3 Επιδημιολογία υπαραχνοειδούς αιμορραγίας.....	23
3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	24
3.1 <u>Παροδικά ισχαιμικά ΑΕΕ</u>	24
3.2 <u>Ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες</u>	26
3.3 <u>Υπαραχνοειδής αιμορραγίες</u>	27
3.4 <u>Ισχαιμικά έμφρακτα</u>	29
3.4.1 Αθηρομβωτικά ΑΕΕ.....	30
3.4.2 Καρδιοεμβολικά ΑΕΕ.....	32
3.4.3 Κενοχωριόδη έμφρακτα.....	33
3.4.4 Έμφρακτα αδιευκρινίστης αιτιολογίας (κρυπτογενή).....	35
3.4.5 Έμφρακτα άλλης αιτιολογίας.....	36
4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΙΣΧΑΙΜΙΚΑ ΑΕΕ.....	36
5. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΑΙΜΑΤΩΣΗ.....	38
5.1 Καρωτιδικό σύστημα.....	40
5.2 Σπονδυλοβασικό σύστημα.....	41
5.3 Αναστομώσεις.....	42
6. ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΒΛΑΒΗΣ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ.....	45
7. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΑΙΜΑΤΩΣΗ.....	50
8. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ.....	53
9. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ.....	57
9.1 Ορισμός.....	57
9.2 Παθογένεια της αθηροσκλήρωσης-Θεωρίες.....	57
10. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΜΩΔΕΙΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΑΕΕ.....	63

11. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΕΕ.....	67
11.1 Εισαγωγή.....	67
11.2 Γενετικοί παράγοντες και ενδιάμεσοι φαινότυποι.....	67
11.3 Μονογονιδιακές διαταραχές.....	71
11.4 Παθήσεις του συνδετικού ιστού.....	79
11.5 Πολυπαραγοντικό ΑΕΕ και γενετικοί παράγοντες ισχαιμικού ΑΕΕ.....	83

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ALOXAP ΚΑΙ ΑΕΕ.....	89
2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	94
3 ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	96
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	99
4.1 ALOX5AP.....	99
4.2 Απομόνωση DNA.....	99
4.3 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.....	100
4.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	100
4.3.2 Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης.....	101
4.3.3 Απόδοση αντίδρασης PCR.....	108
4.3.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	109
4.3.5 Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....	110
4.4 Μέθοδος υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξη DNA (HRMA).....	113
4.5 Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA.....	119
4.5.1 Αρχή της μεθόδου.....	119
4.5.2 Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης.....	122
4.6 Μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενομικού υβριδισμού (array CGH).....	125
4.6.1 Αρχή της μεθόδου.....	125
4.6.2 Διαδικασία της μεθόδου array CGH.....	128
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	130
5.1 ALOX5AP (HRMA).....	130
5.2 Αποτελέσματα Array CGH.....	138
5.2.1 COL4a1&a2.....	138
5.2.2 TBX1.....	141
5.2.3 TNX.....	143
6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	147
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΠΙΝΑΚΑΣ 6	

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη, η οποία αποτελεί και το προϊόν της διδακτορικής μου διατριβής, διενεργείται για πρώτη φορά στον Ελληνικό πληθυσμό.

Και λέω για πρώτη φορά διότι, προσπάθησα να αναζητήσω την συσχέτιση των μονονουκλεοτιδικών αλλαγών του γονιδίου ALOX5AP στον κίνδυνο εμφάνισης Αγγειακού Εγκεφαλικού Επεισοδίου στον Ελληνικό πληθυσμό, συσχέτιση την οποία είχαν επισημάνει μελέτες στο εξωτερικό και είχαν καταλήξει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Πιστεύω λοιπόν ότι ως ένα βαθμό κατάφερα, αφενός μεν, να ικανοποιήσω την προσωπική μου «περιέργεια», αφετέρου δε, να συμβάλλω και εγώ, με τα όποια αποτελέσματα προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, σε κάποια επιπρόσθετα συμπεράσματα.

Να σημειώσω ότι η μελέτη αυτή, εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Ιατρικής γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, και έτσι είχα την τιμή αλλά και την μοναδική ευκαιρία, να έρθω σε επαφή με την επιστήμη της γενετικής αλλά και τους ακούραστους υποστηρικτές της, όπως: τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής,

Καθηγητή Κο Καναβάκη Εμμανουήλ, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Κα Κίτσιου Σοφία και την Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής Κα Τζέτη Μαρία για την μεγάλη βοήθεια την οποία μου προσέφερε απλόχερα.

Επίσης ευχαριστώ την Δρ Πούλου Μυρτώ, την Δρ Φυλακτού Ειρήνη, καθώς και τον ερευνητή Οικονομάκη Βασίλειο, οι οποίοι με βοήθησαν αγόγγυστα και σε μεγάλο βαθμό, στο να κατανοήσω συγκεκριμένες τεχνικές, αλλά και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τον χρόνο που μου αφιέρωσαν αλλά και για το άψογο επίπεδο συνεργασίας που επέδειξαν.

Επίσης, ευχαριστώ εκ βάθρων τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας, Κο Σπέγγο Κωνσταντίνο, δια την συμβολή του στην συλλογή και ομαδοποίηση των δειγμάτων αλλά και την λεπτομερή καταγραφή των στοιχείων του ιστορικού των ασθενών, διότι δίχως αυτά, δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω την μελέτη.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ:	ΠΑΠΑΠΟΣΤΟΛΟΥ
ΟΝΟΜΑ:	ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ
ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ:	ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ
ΜΗΤΡΩΝΥΜΟ:	ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝ.:	ΑΘΗΝΑ
ΗΜΕΡ. ΓΕΝΝ.:	09-11-1972
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:	ΗΡ. ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟΥ 61 ΠΕΙΡΑΙΑΣ
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ:	ΙΑΤΡΟΣ-ΝΕΥΡΟΛΟΓΟΣ
ΟΙΚΟΓ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:	ΕΓΓΑΜΟΣ (δυο τέκνα)
ΣΤΡΑΤ. ΥΠΟΧΡ.:	ΕΚΠΛΗΡΩΜΕΝΕΣ
ΤΗΛ:	210-4511106, 693-7070569.
e-mail:	apapas55@yahoo.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Μετεκπαιδευθείς στο Εργαστήριο Ηλεκτροφυσιολογίας του Πανεπιστημίου της Ουψάλας-Σουηδία.
- Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών Γνωστικό αντικείμενο: Γενετική
Θέμα: <Γενετικοί παράγοντες στην παθογένεση των Αγγειακών Εγκεφαλικών Επεισοδίων>.
- Απόκτηση ειδικότητας Νευρολογίας (2^{ος}/2006)
- Πτυχιούχος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, με βαθμό «Λίαν Καλώς».
- Απόφοιτος του Ζαννείου Προτύπου Πειραματικού Λυκείου Πειραιά.

ΙΑΤΡΙΚΗ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗ

- 2010- Υγειονομικός Αξιωματικός ΕΛ.ΑΣ
- 2009-2010: Επιμελητής Νευρολογικής Κλινικής Νοσοκομείου ΤΥΠΕΤ
- 2006-2009: Επιμελητής Νευρολογικής κλινικής Νοσοκομείου Μετροπόλιταν
- Ιατρός Νευρολόγος Πολυιατρεία ασφαλισμένων ΔΕΗ
- Τριάντα τρεις μήνες (33) Ειδικευόμενος Νευρολογίας, Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική του Αιγινήτειου Νοσοκομείου Αθηνών – πέρας ειδικότητας, τέλη Δεκεμβρίου 2005.
Ενεργός συμμετοχή στο ειδικό Κλινικό Τμήμα Αγγειακών Εγκεφαλικών Επεισοδίων (ΑΕΕ)– Παρακολούθηση ασθενών με ΑΕΕ καθώς και ασθενών με αγγειακή άνοια, στα ειδικά Εξωτερικά Ιατρεία ΑΕΕ.
- Δώδεκα (12) μήνες Ειδικευόμενος Νευρολογίας, Νευρολογική Κλινική του Ψυχιατρικού Νοσοκομείου Τριπόλεως.

Ενεργός συμμετοχή στα έκτακτα/τακτικά εξωτερικά Ιατρεία και ειδικότερα, στο Νευροφυσιολογικό εργαστήριο.

- Έξι μήνες (6) Ειδικευόμενος Ψυχιατρικής, Ψυχιατρικό Νοσοκομείο Αττικής (Δρομοκαίτειο).
- Έξι μήνες (6) Ειδικευόμενος Παθολογίας, Παθολογική Κλινική του Παναρκαδικού Νοσοκομείου Τριπόλεως.
- Τρεις μήνες (3) Ειδικευόμενος Παθολογίας, Παθολογική Κλινική του Ν.Γ.Ν. Ναυπλίου
- Δώδεκα μήνες (12) Υπηρεσία Υπαίθρου, Περιφερειακό Ιατρείο Ερμιόνης.

EPEYNA

- Συμμετοχή ως ερευνητής στο Κλινικό Πρωτόκολλο της Σουμανιρόλης 666E- CNS- 0075- 022 με τίτλο « Τυχαιοποιημένη, Φάσης ΙΙΙ, διπλή τυφλή, συγκριτική με εικονικό φάρμακο κλινική μελέτη που συγκρίνει την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια και την ανοχή της Σουμανιρόλης έναντι του εικονικού φαρμάκου ή της Ροπινιρόλης, ως επικουρική της Λεβοντόπα, σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο του Parkinson».
- Συμμετοχή ως ερευνητής στο Κλινικό Πρωτόκολλο της Ροσιγλιταζόνης με τίτλο: «Μια ανοιχτή προέκταση της μελέτης AVA100193 (Φάσης ΙΙ), για την αξιολόγηση της μακροπρόθεσμης ασφάλειας της ροσιγλιταζόνης (δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης) σε ασθενείς που πάσχουν από νόσο Alzheimer ήπιας ως μέτριας βαρύτητας».

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **Are ALOX5AP gene SNPs a risk or protective factor for stroke?**
Apostolis Papapostolou, Kostas Spengos, Irene Fylaktou, Myrto Poulou, Ilias Gountas, Sophia Kitsiou-Tzeli, Emmanuel Kanavakis, Maria Tzetzis. Gene epub, June 2014
- **Impaired interhemispheric inhibition in amyotrophic lateral sclerosis.**
Karandreas N, Papadopoulou M, Kokotis P, Papapostolou A, Tsivgoulis G, Zambelis T. Amyotroph Lateral Scler. 2007 Apr;8(2):112-8.
- **Bilateral drop foot due to thoracic disc herniation.**
Papapostolou A, Tsivgoulis G, Papadopoulou M, Karandreas N, Zambelis T, Spengos K. Eur J Neurol. 2007 Feb;14(2):e5.
- **Intraoperative radial nerve injury during coronary artery surgery--report of two cases.**
Papadopoulou M, Spengos K, Papapostolou A, Tsivgoulis G, Karandreas N. J Brachial Plex Peripher Nerve Inj. 2006 Dec 5;1:7.
- **Thyroid function in patients with Alzheimer disease: implications on response to anticholinesterase treatment.**
Kapaki E, Paraskevas GP, Mantzou E, Papapostolou A, Alevizaki M, Vassilopoulos D. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2006 Oct-Dec;20(4):242-7.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **European Conference of Human Genetics 2014, May 31 – June 3, Milan, Italy**
Are ALOX5AP gene SNPs a risk or protective factor for stroke?
Apostolis Papapostolou, Kostas Spengos, Irene Fylaktou, Myrto Poulou, Ilias Gountas, Sophia Kitsiou-Tzeli, Emmanuel Kanavakis, Maria Tzetis.
- **15th European Stroke Conference:**
 1. Entire corpus callosum infarction-an unusual variant of watershed ischemia.
K. Spengos, G. Tsivgoulis, A. Papapostolou, E. Manios, M. Papadopoulou, N. Zakopoulos, V. Zis.
 2. Potential applicability of the ABCD score in identifying individuals at high early risk of stroke following a transient ischemic attack: a hospital-based case series study
G. Tsivgoulis, K. Spengos, E. Manios, A. Papapostolou, M. Papadopoulou, E. Koroboki, N. Zakopoulos, D. Vassilopoulos.
 3. Factors associated with neuroimaging evidence of infarction in patients with transient ischemic attacks.
G. Tsivgoulis, K. Spengos, E. Manios, M. Papadopoulou, A. Papapostolou, E. Koroboki, N. Zakopoulos, D. Vassilopoulos.
- **21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευρολογίας:**
Οι 24ωρες καταγραφές αρτηριακής πίεσης αποτελούν σε σύγκριση με τις συμβατικές μετρήσεις την πιο αξιόπιστη μέθοδο για τον έλεγχο της καλής ρύθμισης της υπέρτασης σε ασθενείς μετά από ΑΕΕ.
Παπαποστόλου Α, Σπέγγος Κ, Τσιβγούλης Γ, Μανιός Ε, Συνετού Μ, Ζής Β, Ζακόπουλος Χ, Βέμμος Κ
- **18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευρολογίας:**
 - I. Πρόδρομα συμπτώματα στην νόσο του Πάρκινσον (προφορική παρουσίαση).
Παπαποστόλου Α, Μούκας Γ, Σαμέλη Σ, Αντέλλη Α, Παναγιωτοπούλου Β, Τάγαρης Γ, Παπαδόπουλος Κ, Βρέντας Π.
 - II. Διαταραχές από το Αυτόνομο Νευρικό σύστημα στα διάφορα στάδια της νόσου του Πάρκινσον.
Βρέντας Π, Σαμέλη Σ, Αντέλλη Α, Μούκας Γ, Παπαποστόλου Α, Παναγιωτοπούλου Β, Κανταρτζής Σ, Παπαδόπουλος Κ.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Καλή γνώση.

ΓΝΩΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

Πολύ καλός χειρισμός

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκπόνηση της ανωτέρω διδακτορικής διατριβής με θέμα : «**Γενετικοί παράγοντες στην παθογένεση των Αγγειακών Εγκεφαλικών Επεισοδίων**» ξεκίνησε το Απρίλιο του 2006 στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής με σκοπό την συσχέτιση των μονονουκλεοτιδικών αλλαγών (SNPs) στο γονίδιο ALOX5AP και τον κίνδυνο εμφάνισης Αγγειακού Εγκεφαλικού Επεισοδίου στον Ελληνικό πληθυσμό.

Το γονίδιο ALOX5AP κωδικοποιεί την 5 λιποξυγενάση ενεργοποιό πρωτεΐνη (FLAP) που είναι σημαντικός μεσολαβητής στην λειτουργία της κυτταρικής 5 – λιποξυγενάσης (5-LO), η οποία είναι ένζυμο κλειδί για την βιοσύνθεση των λευκοτριενών.

Οι λευκοτριένες είναι προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές οι οποίοι παράγονται κυρίως στα φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα πολυμορφοπύρρηνα, μακροφάγα και μαστοκύτταρα. Οι λευκοτριένες αν και έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες φλεγμονώδεις απαντήσεις, τα τελευταία χρόνια έχουν εμπλακεί στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Συνολικά στο εργαστήριο έχουν επιτευχθεί τα εξής: Με την μέθοδο υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξης του DNA (High Resolution Melting Analysis-HRMA) εξετάσθηκε με αλληλούχηση ολόκληρη η κωδικοποιούσα περιοχή στα πέντε εξόνια καθώς και στις γειτονικές ιντρονικές περιοχές του γονιδίου ALOX5AP, σε 213 Έλληνες ασθενείς με ΑΕΕ και σε 210 Έλληνες υγιείς μάρτυρες. Όπως προαναφέρθηκε, τα ανωτέρω διενεργήθηκαν για να ερευνηθεί ο ρόλος των μονονουκλεοτιδικών αλλαγών (SNPs) στο γονίδιο ALOX5AP και η πιθανότητα ή μη εμφάνισης ΑΕΕ στον Ελληνικό πληθυσμό.

Όπως προαναφέρθηκε, συνολικά συμμετείχαν 213 ασθενείς και κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με την κατάταξη TOAST: ΑΕΕ μεγάλων αγγείων (43), , καρδιοεμβολικά (14), ακαθόριστα (31), άλλης γνωστής αιτιολογίας (12) και μικρών αγγείων (87) και με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία (27). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 58,9+/-14,64, με 145 άνδρες και 68 γυναίκες. Η ομάδα των μαρτύρων αποτελείτο από 210 άτομα ίδιας ιθαγενείας, φύλου και ηλικίας, χωρίς ιστορικό ΑΕΕ και στεφανιαίας νόσου. Ως παράγοντες κινδύνου στους ασθενείς καταγράφηκαν: υπερλιπιδαιμία, υπέρταση, κολπική μαρμαρυγή, ημικρανία, στεφανιαία νόσος, σακχαρώδης διαβήτης, κάπνισμα και κατάχρηση αλκοόλ.

Στατιστικά, σημαντική διαφορά ($p < 0,01$) μεταξύ ασθενών και μαρτύρων παρατηρήθηκε στις SNPs: rs4769055, rs202068154 και rs3803277. Πιο συγκεκριμένα, οι γονότυποι CA και AA για το rs4769055 θεωρούνται προστατευτικοί για την ανάπτυξη ΑΕΕ, από την στιγμή που οι φορείς έδειξαν 45% και 91,5% αντίστοιχα μικρότερη πιθανότητα κινδύνου για ΑΕΕ (OR:0.551, 95%CI:0.328-0.9253, p -value=0.024 and OR:0.085, 95%CI:0.046-0.158, p -value<0.001 αντίστοιχα).

Για το rs202068154 η ύπαρξη C είτε σε ετεροζυγωτία είτε σε ομοζυγωτία (γονότυποι AC ή CC) έχει 85% μικρότερη πιθανότητα για ανάπτυξη ΑΕΕ (OR:0.150, 95%CI:0.030-0.753, p -

value=0.021). Μόνο η rs3803277 βρέθηκε να έχει διαφορετικό κίνδυνο για τους υπότυπους AEE. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ετεροζυγωτία (CA) ή ομοζυγωτία (AA) για το μικρό αλληλίο έχουν 66% και 82% αντίστοιχα μικρότερη πιθανότητα να αναπτύξουν AEE από νόσο των μικρών αγγείων, παρά από οποιοδήποτε άλλον υπότυπο AEE (OR:0.337, 95% CI:0.178-0.638, p-value=0.001 and OR:0.179, 95%CI:0.059-0.537, p-value=0.022 αντίστοιχα).

Όλα τα ανωτέρω SNPs τοποθετούνται στις ιντρονικές περιοχές του γονιδίου και σύμφωνα με προγράμματα *in silico* EX_SKIP και HSF, επηρεάζουν το μάτισμα των εξονίων 1 και 2 του ALOX5AP.

Τα αποτελέσματα είναι καταδεικνύουν ότι οι προαναφερόμενες SNPs ασκούν προστατευτικό ρόλο είτε σε ομοζυγωτία είτε σε ετεροζυγωτία της μικρής συχνότητας των αλληλίων (MAF).

Εκ των ανωτέρω ασθενών, επιλέχθηκαν 16 όπου διερευνήθηκαν σε όλα τα γονίδια με μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενομικού υβριδισμού (array CGH). Οι ασθενείς αυτοί, είχαν ως κύριο χαρακτηριστικό ότι έπασχαν από συμπτωματική εξωκράνια ή ενδοκράνια στένωση ή απόφραξη των αρτηριών, χωρίς άλλους παράγοντες κινδύνου δηλαδή υπέρταση, στεφανιαία νόσος, υπερλιπιδαιμία, σάκχαρο, κάπνισμα και με αρνητική διερεύνηση για καρδιολογικό νόσημα που να ευθύνεται για το AEE. Συγκεκριμένα, οι 8 ασθενείς (4 άνδρες και 4 γυναίκες) είχαν εξωκράνια συμπτωματική στένωση καρωτίδας (εκ των οποίων 2 άνδρες και 1 γυναίκα είχαν απόφραξη καρωτίδος) και οι 4 ασθενείς (3 άνδρες και 1 γυναίκα) είχαν συμπτωματική ενδοκράνια στένωση (1 ασθενής με στένωση βασικής αρτηρίας και 3 ασθενείς με στένωση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας). Εκ των 16 ασθενών, οι τέσσερις ασθενείς (άνδρες) είχαν υποστεί αιμορραγικό AEE (2 ημισφαιρικά και 2 στα βασικά γάγγλια) με παράγοντα κινδύνου την αρτηριακή υπέρταση.

Από την ομάδα των συμπτωματικών εξωκράνιων στενώσεων της καρωτίδας, από τους συνολικά 8 ασθενείς βρέθηκε ένας άνδρας ασθενής που φέρει μοριακές διαταραχές (CNVs) στις χρωμοσωμικές περιοχές που περιέχουν τα γονίδια: *TBX1*, *COL4A1*, *COL4A2*, καθώς και μια γυναίκα ασθενής με απόφραξη καρωτίδος με CNVs στην χρωμοσωμική περιοχή που περιέχει το γονίδιο *TBX1*.

Στην ομάδα των συμπτωματικών ενδοκράνιων στενώσεων, από τους 4 ασθενείς βρέθηκαν 2 (ένας άνδρας και μια γυναίκα) να φέρουν CNVs στην χρωμοσωμική περιοχή που περιέχει το γονίδιο *TNXA*. Στην ομάδα των αιμορραγικών AEE, σε τρεις ασθενείς βρέθηκαν CNVs στις περιοχές που περιέχουν τα γονίδια *TNXA* και *TBX1*.

ABSTRACT

ALOX5AP (5-lipoxygenase) has been recognized as a susceptibility gene for stroke. Using a case-control design, the whole coding and adjoining intronic regions of *ALOX5AP* was sequenced to study the role of SNPs and their interplay with other risk factors in Greek patients with stroke. Patients (n=213) were classified by the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). Their mean age of was 58.9 ± 14.64 , comprising 145 males. The control group consisted of 210 subjects, ethnicity, sex and age matched, with no stroke history. Risk factors (hyperlipidemia, hypertension, atrial fibrillation, migraine, CAD, diabetes, smoking and alcohol consumption) were assessed as confounding factors and comparisons were done using logistic regression analysis. SNPs rs4769055, rs202068154 and rs3803277 located in intronic regions of the gene and according to *in silico* programs EX_SKIP and HSF possibly affecting splicing of exons 1 and 2 of *ALOX5AP*, showed significantly different frequencies between patients and controls. The genotype frequencies of rs4769055: AA, of rs202068154: AC and of rs3803277: CA were significantly higher ($p < 0.001$, 0.058) in controls than in patients. The results were indicative of a protective role of the three SNPs either in homozygosity or heterozygosity for MAF and more specifically rs3803277: CA/AA genotypes were protective against SVO stroke subtype.

Key words: *ALOX5AP*/ mutations/ SNPs/ splicing/ Stroke

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Ο όρος Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο (ΑΕΕ) χρησιμοποιείται ευρέως και περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- **Ορισμός εμφράκτου του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ):**

Ως έμφρακτο του (ΚΝΣ) ορίζεται ο θάνατος των κυττάρων (εγκεφαλικών, νωτιαίου μυελού και αμφιβληστροειδούς) που προέκυψε μετά από ισχαιμία και αποδείχθηκε μετά από:

- 1) απεικονιστικές μεθόδους ή άλλων αντικειμενικών στοιχείων τοπικής ισχαιμικής βλάβης εγκεφάλου, νωτιαίου μυελού ή αμφιβληστροειδούς σε συγκεκριμένη αγγειακή κατανομή, ή
- 2) κλινικά στοιχεία τοπικής ισχαιμικής βλάβης (εγκεφαλικής, νωτιαίου μυελού ή αμφιβληστροειδούς) βασιζόμενη σε συμπτώματα με διάρκεια >24 ωρών ή ως αποτέλεσμα νεκροτομής, και έχουν αποκλεισθεί άλλες αιτιολογίες.
(σημείωση: ο όρος έμφρακτο του ΚΝΣ περιλαμβάνει και αιμορραγικά έμφρακτα τύπου I&II*)

- **Ορισμός ισχαιμικού ΑΕΕ:**

Ως ισχαιμικό (ΑΕΕ) ορίζεται το επεισόδιο νευρολογικής δυσλειτουργίας οφειλόμενο σε εστιακό έμφρακτο του εγκεφάλου, νωτιαίου μυελού ή του αμφιβληστροειδούς.

- **Ορισμός σιωπηλού εμφράκτου ΚΝΣ:**

Ως σιωπηλό έμφρακτο του (ΚΝΣ) ορίζεται το έμφρακτο που προκύπτει μετά από απεικονιστικό ή νευροπαθολογοανατομικό έλεγχο, χωρίς την ύπαρξη ιστορικού οξείας νευρολογικής δυσλειτουργίας τοπογραφικά συμβατής με το έμφρακτο.

- **Ορισμός της ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας:**

Η εστιακή συλλογή αίματος εντός του εγκεφαλικού παρεγχύματος ή του κοιλιακού συστήματος που δεν έχει προκληθεί από τραυματισμό. (σημείωση: ο όρος εγκεφαλική αιμορραγία περιλαμβάνει και τις αιμορραγίες του παρεγχύματος που προκύπτουν μετά από ισχαιμικό έμφρακτο ΚΝΣ, τύποι I&II**).

- **Ορισμός του ΑΕΕ που προκλήθηκε μετά από ενδοεγκεφαλική αιμορραγία:**

Ταχέως εξελισσόμενα κλινικά συμπτώματα νευρολογικής δυσλειτουργίας, συμβατών με τοπική συγκέντρωση αίματος - που δεν έχει προκληθεί από τραυματισμό - εντός του εγκεφαλικού παρεγχύματος ή του κοιλιακού συστήματος.

- **Ορισμός σιωπηλούς εγκεφαλικής αιμορραγίας:**

Τοπική συγκέντρωση παραγώγων αίματος, σε χρόνια φάση, εντός του εγκεφαλικού παρεγχύματος, υπαραχνοειδή χώρο, ή στο κοιλιακό σύστημα, που δεν έχουν προκληθεί από τραύμα και χωρίς να υφίσταται ιστορικό οξείας νευρολογικής δυσλειτουργίας τοπογραφικά συμβατής με την βλάβη.

- **Ορισμός της υπαραχνοειδούς αιμορραγίας:**

Αιμορραγία εντός του υπαραχνοειδούς χώρου.

- **Ορισμός του ΑΕΕ λόγω υπαραχνοειδούς αιμορραγίας:**

Ταχέως εξελισσόμενα συμπτώματα νευρολογικής δυσλειτουργίας και/ή κεφαλαλγία λόγω αιμορραγίας εντός του υπαραχνοειδούς χώρου η οποία δεν έχει προκληθεί από τραύμα.

- **Ορισμός του ΑΕΕ λόγω θρόμβωσης των φλεβωδών κόλπων:**

Έμφρακτο ή αιμορραγία στον εγκέφαλο, νωτιαίο μυελό, ή αμφιβληστροειδή λόγω θρόμβωσης κάποιου φλεβώδη κόλπου. Τα συμπτώματα που προκλήθηκαν από αναστρέψιμο οίδημα χωρίς έμφρακτο ή αιμορραγία δεν προσμετρώνται ως συμπτωματολογία του ΑΕΕ.

- **Ορισμός μη καθορισμένου ΑΕΕ:**

Επεισόδιο οξείας νευρολογικής δυσλειτουργίας το πιθανότερο στα πλαίσια ισχαιμίας ή αιμορραγίας, διάρκειας >24 ωρών ή έως την κατάληξη του θανάτου, αλλά χωρίς ύπαρξη στοιχείων ώστε να κατηγοριοποιηθεί σε ένα από τα παραπάνω. (Sacco RL και συνεργάτες 2013).

***Το αιμορραγικό έμφρακτο τύπου I** ορίζεται από πετεχειώδεις αιμορραγίες στην περίμετρο του ισχαιμικού εμφράκτου, ενώ στο αιμορραγικό έμφρακτο τύπου II υφίστανται συρρέουσες αιμορραγικές πετέχειες εντός του εμφράκτου αλλά χωρίς χωροκατακτητικά στοιχεία.

****Η ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία τύπου I** περιορίζεται στο <30% της περιοχής του ισχαιμικού εμφράκτου με ήπια χωροκατακτητικά στοιχεία. Η ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία τύπου II αναπτύσσεται στο >30% της ισχαιμικής εμφρακτικής περιοχής και/ή με αρκετά χωροκατακτητικά στοιχεία. Ως εκ τούτου η παρεγχυματικές

αιμορραγίες τύπου I&II μετά από ισχαιμικό έμφρακτο ΚΝΣ θα πρέπει να αντιμετωπίζονται όπως οι ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες γενικότερα. (Sacco RL και συνεργάτες Stroke 2013).

Ως **παροδικό ΑΕΕ** καθορίζεται ένα παροδικό επεισόδιο νευρολογικής δυσλειτουργίας οφειλόμενο σε τοπική ισχαιμία του εγκεφάλου, νωτιαίου μυελού ή του αμφιβληστροειδούς χωρίς την δημιουργία εμφράκτου. Ουσιαστικά, ο ορισμός στηρίζεται στην απουσία βλάβης του τελικού οργάνου όπως αυτή καθορίζεται από απεικονιστικές ή άλλες τεχνικές (Easton JD και συνεργάτες 2009).

2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το ποσοστό όλων των τύπων ΑΕΕ (ισχαιμία, ενδοεγκεφαλική και υπαραχνοειδής αιμορραγία) είναι 87%, 10% και 3% αντίστοιχα (Roger VL et al 2011). Η ετήσια επίπτωση νέου ΑΕΕ ή υποτροπής ΑΕΕ στις Ηνωμένες πολιτείες Αμερικής είναι 795,000 εκ των οποίων 610,000 είναι νέα ΑΕΕ και 185,000 είναι υποτροπές ΑΕΕ (Roger VL και συνεργάτες 2011). Οι άνδρες παρουσιάζουν μεγαλύτερη προδιάθεση σε σύγκριση με τις γυναίκες στις μικρότερες ηλικίες αλλά αυτό αντιστρέφεται από τις ηλικίες άνω των 75 ετών (Roger VL και συνεργάτες 2011).

2.1 Επιδημιολογία ισχαιμικού ΑΕΕ

Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στην πρόληψη και την θεραπεία των νοσημάτων, το ΑΕΕ παραμένει η 3^η αιτία θανάτου παγκοσμίως και είναι το πρώτο αίτιο αναπηρίας είτε σωματικής είτε νοητικής (Falcone Guido και συνεργάτες 2014).

Ο επιπολασμός του ΑΕΕ μεταξύ των Αμερικανών, Αφροαμερικανών, λευκών, και Ασιατών από 18 ετών και άνω είναι 6%, 4%, 2,3% και 1,6% αντίστοιχα. Οι λατίνοι έχουν διπλάσιες πιθανότητες εμφάνισης ΑΕΕ σε σύγκριση με τους μη λατίνους λευκούς μεταξύ των ηλικιών 45-59 (Morgenstern και συνεργάτες 2004).

Η συχνότητα του σιωπηλού ΑΕΕ μεταξύ των ηλικιών 55-64 είναι περίπου 11%, αυξάνει κατά 22% μεταξύ των ηλικιών 65-69, και 28% μεταξύ των ηλικιών 70-74, 32% μεταξύ των ηλικιών 75-79, 40% μεταξύ των ηλικιών 80-85, 43% σε ηλικίες άνω των 85 ετών (Lloyd-jones και συνεργάτες 2010).

Με βάση στοιχεία μελετών (Rochester, Minnesota) η μέση ετήσια επίπτωση του ΑΕΕ έχει μειωθεί από 183 σε 102/100000 ανθρώπους μεταξύ των ετών 1945-1954 και 1975-1984 (Broderick και συνεργάτες 1989). Πιθανοί λόγοι της μείωσης είναι η θεραπεία της υπέρτασης.

Η εισαγωγή της αξονικής τομογραφίας εγκεφάλου αύξησε την εμφάνιση των ΑΕΕ από το 1980-1984 σε σύγκριση με 1975-1979 με την έννοια της ανακάλυψης μικρότερων σε έκταση επεισοδίων. Μια πρόσφατη μελέτη από την περιοχή greater Cincinnati/Northern Kentucky των Ηνωμένων πολιτειών αναφέρει μείωση της μέσης ηλικίας εμφάνισης ΑΕΕ, δηλ: το 1993-1994 ήταν 71,3 έτη, 1999 ήταν 70,9 έτη, και το 2005 ήταν 68,4 έτη (Kissela και συνεργάτες 2010).

Το ποσοστό των ασθενών με ΑΕΕ νεώτερων των 45 ετών αυξήθηκε από 4,5% το 1993-1994 σε 5,5% το 1999 και σε 7,3% το 2005. Η εμφάνιση του ΑΕΕ αυξήθηκε περίπου στο διπλάσιο σε λευκούς ασθενείς ηλικίας 20-45 ετών (από 12/100000 σε 25 /100000). Το αίτιο της παραπάνω αλλαγής είναι αβέβαιο και πιθανόν αντανακλά σε αλλαγές στην διαίτα και στην φυσική άσκηση. Η εμφάνιση ΑΕΕ σε ασθενείς >65 ετών μειώθηκαν, το πιθανότερο λόγω καλύτερης αντιμετώπισης της αρτηριακής υπέρτασης.

2.2 Επιδημιολογία της μη τραυματικής ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας

Η μη τραυματική ενδοεγκεφαλική αιμορραγία αποτελεί το 8%-15% πρωτοεμφανιζόμενου ΑΕΕ στην Αυστραλία, Αγγλία και στις Ηνωμένες Πολιτείες (Broderick και συνεργάτες 2007), καθώς και το 25% των ΑΕΕ στην Ιαπωνία (Kimura και συνεργάτες 1998). Η επίπτωση κυμαίνεται από 12 σε 31 περιστατικά ανά 100000 ανθρώπους και μεταβάλλεται με την φυλή (Lobovitz και συνεργάτες 2005, Flaherty ML και συνεργάτες 2007). Επίσης η επίπτωση αυξάνει με την ηλικία, συγκεκριμένα διπλασιάζεται κάθε 10 χρόνια μετά την ηλικία των 35 (Stein M και συνεργάτες 2012).

Μολονότι υπήρξε μείωση την περίοδο 1950 με 1979 το πιθανότερο στα πλαίσια θεραπείας της αρτηριακής υπέρτασης (Furlan και συνεργάτες 1979) δυστυχώς ο αριθμός αναμένεται να αυξηθεί τις επόμενες δεκαετίες λόγω της αυξανόμενης ηλικίας του πληθυσμού (Huang CY και συνεργάτες 2001). Ο επιπολασμός της αιμορραγίας λόγω χρήσης αντιπηκτικής αγωγής διπλασιάστηκε την δεκαετία του 1990. Στην παρούσα φάση η αιμορραγία εκ αντιπηκτικών συμβαίνει συχνότερα από ότι η υπαραχνοειδής αιμορραγία (Flaherty ML και συνεργάτες 2007)

Έχουν παρατηρηθεί φυλετικές διαφορές επίπτωσης, για παράδειγμα ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης αιμορραγίας στους έγχρωμους σε σύγκριση με τους λευκούς είναι 4,8, καθώς και 3,7 στους Ισπανόφωνους σε σύγκριση με τους λευκούς (Lobovitz και συνεργάτες 2005), επίσης οι Μεξικάνοι που κατοικούν στις Ηνωμένες πολιτείες έχουν υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τους λευκούς (Zahuranec DB, Brown DL, Lisabeth LD 2006).

Η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία είναι αρκετά συχνή σε Ασιατικούς πληθυσμούς πιθανότερα αντανακλώντας αυξημένη συχνότητα νόσου των μικρών

αγγείων, υπέρτασης, και γενετικών παραγόντων. Το κληρονομικό αναμνηστικό είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την μη λοβώδη αιμορραγία σε ηλικίες μεγαλύτερες των 70 ετών. Επίσης η ύπαρξη της Apo E4 είναι παράγοντας κινδύνου όχι όμως για ηλικίες μικρότερες των 70 ετών (Woo και συνεργάτες 2005). Επιπλέον οι άνδρες έχουν περισσότερες πιθανότητες εμφάνισης αιμορραγίας σε σύγκριση με τις γυναίκες (σχετικός κίνδυνος 1,8) (Labovitz και συνεργάτες 2005). Επιπροσθέτως χαμηλά κοινωνικο-οικονομικά στρώματα παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης (Jakovijevic και συνεργάτες 2001).

2.3 Επιδημιολογία υπαραχνοειδούς αιμορραγίας

Η ετήσια επίπτωση της ανευρυσματικής υπαραχνοειδούς αιμορραγίας φαίνεται να εξαρτάται από την γεωγραφική περιοχή. Στις Ηνωμένες Πολιτείες αναφέρεται επίπτωση 10-15 ανθρώπους ανά 100,000 άτομα (Labovitz DL και συνεργάτες 2006). Στην Κίνα αναφέρεται μικρότερο ποσοστό (2 περιστατικά ανά 100.000), στην Νότια και Κεντρική Αμερική (4 περιστατικά ανά 100.000), ενώ μεγαλύτερα ποσοστά αναφέρονται στην Φιλανδία και στην Ιαπωνία (19-23 περιστατικά ανά 100.000) (De Rooij NK και συνεργάτες 2007)

Περίπου 30,000 αυτόματες υπαραχνοειδής αιμορραγίες συμβαίνουν ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Beterson et al 2009). Το ηλικιακό όριο εμφάνισης είναι 50-60 έτη, επίσης είναι πιο συχνό φαινόμενο στις γυναίκες παρά στους έγχρωμους. (Broderick et al 1992, Beterson et al 2009).

Η μη τραυματική ή αυτόματη υπαραχνοειδής αιμορραγία συμβαίνει στο 1%-7% όλων των ΑΕΕ. Μολονότι περίπου το 5% του πληθυσμού έχει ενδοκράνιο ανεύρυσμα, η συντριπτική πλειοψηφία των ανευρυσμάτων ποτέ δεν ρήγνυται. Επίσης το 20%-30% των ανθρώπων με ανεύρυσμα έχουν πολλαπλά ανευρύσματα (Stehbens 1963).

3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Με βάση τα κριτήρια της American Heart Association (Adams και συνεργάτες 2003) και της European Stroke Initiative (Hacke και συνεργάτες 2000), η διάκριση των ισχαιμικών από τα αιμορραγικά ΑΕΕ πρέπει να γίνεται με βάση τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας ή το αποτέλεσμα της νεκροτομής. Ο καθορισμός του τύπου του ΑΕΕ μπορεί να αποβεί καθοριστικός για τη σωστή αντιμετώπιση και την καλή έκβαση του ασθενούς. Με τη χρήση της αξονικής ή της μαγνητικής τομογραφίας, καθώς και των άλλων διαγνωστικών μεθόδων, τα ΑΕΕ ταξινομούνται ως εξής (WHO Task Force on Stroke and Other Cerebrovascular Diseases 1989, Caplan 2000a, Adams και συνεργάτες 2003, Hacke και συνεργάτες 2000):

3.1. Παροδικά ισχαιμικά ΑΕΕ

Πρόκειται για επεισόδια εστιακής εγκεφαλικής δυσλειτουργίας που οφείλονται σε εστιακή ισχαιμία, εντοπισμένη σε τμήμα του εγκεφάλου που αιματώνεται από συγκεκριμένο αγγείο χωρίς να ακολουθείται από την δημιουργία εγκεφαλικού εμφράκτου. Παλαιότερα επικρατούσε η άποψη, ότι σε περίπτωση που το επεισόδιο δεν ξεπερνούσε τις 24 ώρες και ακολουθούσε πλήρης αποκατάσταση (όπως αυτό προέκυπτε από την κλινική εικόνα), τότε το επεισόδιο αυτό εκκαλείτο *παροδικό ισχαιμικό ΑΕΕ*. Όμως, ο παραπάνω ορισμός ήτο ανεπαρκής για διάφορους λόγους, όπως: α) είχε το αυθαίρετο όριο των 24 ωρών και β) στηριζόταν καθαρά στην κλινική εικόνα ενώ έχει παρατηρηθεί ότι ακόμη και σχετικά μικρής χρονικής διάρκειας ισχαιμία μπορεί να προκαλέσει μόνιμη εγκεφαλική βλάβη (Ay H, et al Ann Neurol 2005). Τελευταία, ως παροδικό ΑΕΕ καθορίζεται ένα παροδικό επεισόδιο νευρολογικής δυσλειτουργίας οφειλόμενο σε τοπική ισχαιμία του εγκεφάλου,

νωτιαίου μυελού ή του αμφιβληστροειδούς χωρίς οξεία απόφραξη. Ουσιαστικά ο ορισμός στηρίζεται στην απουσία βλάβης του τελικού οργάνου όπως αυτή καθορίζεται από απεικονιστικές ή άλλες τεχνικές (Easton JD et al Stroke. 2009). Το προτέρημα του ανωτέρω ορισμού σε σύγκριση με τον παλαιότερο είναι ότι στηρίζεται στην ύπαρξη βλάβης ιστού και δεν στηρίζεται στο αυθαίρετο όριο των 24 ωρών. Επιπλέον, ενθαρρύνει την χρησιμοποίηση νευροαπεικονιστικών μεθόδων προς πιστοποίηση της εγκεφαλικής βλάβης καθώς και του αιτίου αυτής.

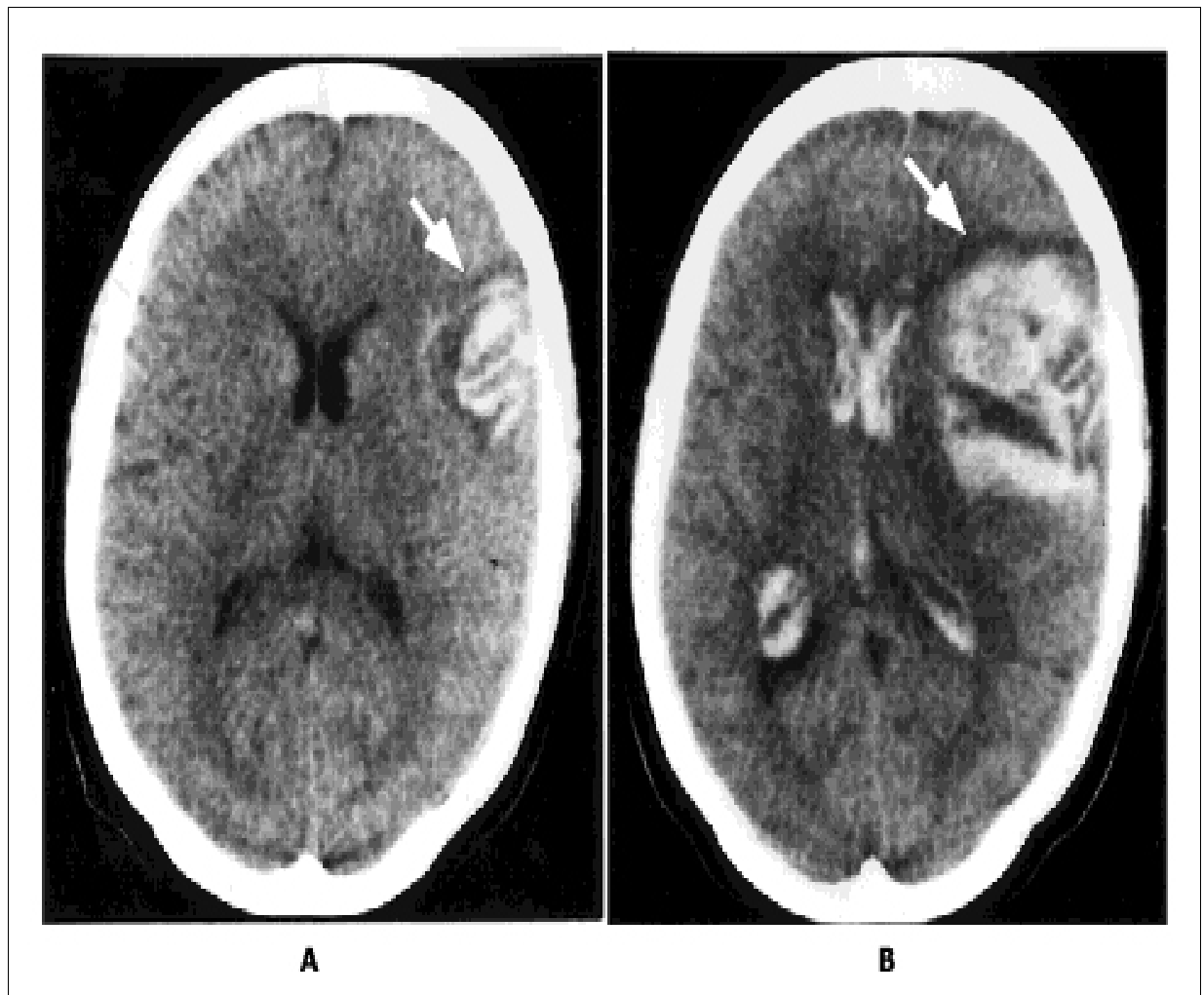
Χαρακτηρίζονται από αιφνίδια εγκατάσταση και η διάρκεια τους κυμαίνεται συνήθως από 2 έως 15 λεπτά. Δεν αφήνουν κανένα μόνιμο νευρολογικό έλλειμμα, αν και όσο αυξάνει η διάρκεια τους τόσο αυξάνεται η πιθανότητα σχηματισμού μόνιμης παρεγχυματικής εγκεφαλικής βλάβης. Από κλινικής άποψης τα παροδικά ισχαιμικά ΑΕΕ έχουν ιδιαίτερη σημασία αφού συνήθως αποτελούν προειδοποίηση για το ενδεχόμενο επέλευσης βαρύτερου ΑΕΕ.

Ο μηχανισμός εμφάνισης παροδικού ΑΕΕ είναι αντίστοιχος με αυτόν των εγκατεστημένων, δηλαδή είτε μειωμένη αιματική παροχή, π.χ. μετά από πτώση της αρτηριακής πίεσης ή από αρρυθμία, είτε απόφραξη αγγείου από εμβολή. Η πτώση της αιματικής παροχής σε επίπεδα 20-30ml/100gr/min είναι ικανή να προκαλέσει νευρολογικά συμπτώματα. Η σύντομη αποκατάσταση της αιματικής ροής οδηγεί και στην πλήρη αποκατάσταση της κλινικής εικόνας χωρίς κατάλοιπα και χωρίς απεικόνιση εμφράκτου. Η κλινική εικόνα εξαρτάται από την εντόπιση της ισχαιμίας. Αν η ισχαιμία αφορά στο *καρωτιδικό σύστημα* τότε παρατηρούνται: θάμβος όρασης, αμαύρωση οφθαλμού, ομώνυμη ημιανοψία, διαταραχές λόγου (αφασία), κινητικές διαταραχές (ημιπάρεση, μονοπάρεση), αισθητικές διαταραχές. Αν η ισχαιμία αφορά στο *σπονδυλοβασικό σύστημα* παρατηρούνται ζάλη, ίλιγγος, δυσαρθρία, διαταραχή ισορροπίας, αταξία, διπλωπία, δυσκαταποσία, διαταραχή επιπέδου συνείδησης και

σπανιότερα ημιπάρεση, ημιυπαισθησία και ημιανοψία. Τα παροδικά ΑΕΕ είναι προειδοποιητικά επερχόμενου ΑΕΕ. Κάθε έτος μετά από παροδικό ΑΕΕ ο κίνδυνος εμφάνισης εγκατεστημένου ΑΕΕ είναι 5-10% με μεγαλύτερη πιθανότητα τους πρώτους 3-6 μήνες. Πιο ειδικά το 10% των ασθενών θα εγκαταστήσουν ΑΕΕ εντός 90 ημερών από το παροδικό και μάλιστα οι μισοί από αυτούς εντός των πρώτων 2 ημερών.

3.2. Ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες

Χαρακτηρίζονται από συλλογή αίματος στο εσωτερικό του εγκεφάλου μετά από ρήξη εγκεφαλικής αρτηρίας και αντιστοιχούν στο 12% του συνόλου των ΑΕΕ. Απεικονιστικά περιγράφεται παρουσία υπέρπυκνης εστιακής βλάβης στην αξονική τομογραφία εγκεφάλου, χωρίς να έχει προηγηθεί τραυματισμός ή να συνυπάρχει κακοήθεια, η οποία είναι συμβατή με την κλινική εικόνα (αιφνίδια έναρξη συμπτωμάτων με ή χωρίς διαταραχή του επιπέδου συνείδησης). Η πλειονότητα των ασθενών με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία έχουν ιστορικό υπέρτασης (60%-80%), ενώ στο υπόλοιπο των περιπτώσεων η αιμορραγία οφείλεται σε παθολογικές καταστάσεις. Η ύπαρξη αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας ή ενδοεγκεφαλικού ανευρύσματος, η λήψη αντιπηκτικής αγωγής και οι διαταραχές της πήξης, οι νεοπλασίες του εγκεφάλου, η εγκεφαλική αμυλοειδική αγγειοπάθεια και οι αγγειίτιδες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) μπορεί να προκαλέσουν ενδοεγκεφαλική αιμορραγία. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις αιμορραγιών αδιευκρίνιστης αιτιολογίας. Οι ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες εντοπίζονται συνήθως στα βασικά γάγγλια, το θάλαμο, τη γέφυρα, την παρεγκεφαλίδα ή στους λοβούς των ημισφαιρίων. (εικόνα 1)



ΕΙΚΟΝΑ 1

Μεγάλης έκτασης ενδοεγκεφαλική αιμορραγία ΑΡ.

Α) αξονική εγκεφάλου στο 1^ο 24-ωρο Β) επαναληπτική αξονική εγκεφάλου στο 3^ο 24-ωρο, λόγω επιδείνωσης της κλινικής εικόνας.

3.3 Υπαραχνοειδείς αιμορραγίες

Οι υπαραχνοειδείς αιμορραγίες οφείλονται σε εξαγγείωση αίματος μέσα στον υπαραχνοειδή χώρο και αποτελούν το 12% του συνόλου των ΑΕΕ. Διακρίνονται σε τραυματικές και αυτόματες (εικόνα 2). Η αυτόματη υπαραχνοειδής αιμορραγία οφείλεται είτε σε ρήξη ανευρύσματος του εξαγώνου του Willis (85%), είτε σε αρτηριοφλεβώδη δυσπλασία (10%). Η τραυματική υπαραχνοειδής αιμορραγία οφείλεται σε κρανιοεγκεφαλική κάκωση ή σε νευροχειρουργική επέμβαση. Κλινικά η

αυτόματη υπαραχνοειδής χαρακτηρίζεται από έντονη κεφαλαλγία αιφνίδιας εγκατάστασης με ινιακή συνήθως εντόπιση ή από αιφνίδια εγκατάσταση διαταραχής του επιπέδου συνείδησης και σημεία ερεθισμού των μηνίγγων (αυχενική δυσκαμψία, σημεία Kernig και Brudzinski). Η επιπλέον παρουσία σημείων εστιακής βλάβης του ΚΝΣ (ημιπάρεση, ημιϋπαισθησία, ημιανοψία, αφασικές διαταραχές) αποτελεί συνήθως ένδειξη επιπρόσθετης βλάβης (εγκεφαλικού οιδήματος, αγγειόσπασμου, ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας). Για να τεκμηριωθεί η διάγνωση της υπαραχνοειδούς αιμορραγίας είναι απαραίτητη η εκπλήρωση ενός από τα παρακάτω κριτήρια:

- i. Απεικόνιση αίματος στην αξονική τομογραφία εγκεφάλου εντός του υπαραχνοειδούς χώρου (συμπεριλαμβανομένων του υδραγωγό του Sylvius και των εγκεφαλικών δεξαμενών) ή των κοιλιών του εγκεφάλου.
- ii. Ύπαρξη πρόσφατης υπαραχνοειδούς αιμορραγίας και εγκεφαλικού ανευρύσματος ή αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας σύμφωνα με τη νεκροτομική μελέτη του θανόντος ασθενούς.
- iii. Η οσφυονωτιαία παρακέντηση θα πρέπει να αποδώσει εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) που ακόμη και μετά από φυγοκέντρηση θα παραμένει ξανθοχρωματικό παρουσιάζοντας περισσότερα από 2×10^9 ερυθρά κύτταρα ανά λίτρο. Η παρουσία περισσότερων από 2×10^9 ερυθρών κυττάρων ανά λίτρο στο ENY σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη αγγειογραφική απεικόνιση ανευρύσματος ή αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας επίσης τεκμηριώνει τη διάγνωση υπαραχνοειδούς αιμορραγίας.. Το κριτήριο της οσφυονωτιαίας παρακέντησης αξιοποιείται όταν η νεκροτομή ή η αξονική τομογραφία εγκεφάλου αποκλείουν την παρουσία ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας αλλά δε θέτουν με σαφήνεια τη διάγνωση της υπαραχνοειδούς αιμορραγίας.



ΕΙΚΟΝΑ 2

Αξονική εγκεφάλου περιμεσεγκεφαλικής μη ανευρισματικής υπαραχνοειδούς αιμοραγίας (κόκκινο βέλος)

3.4 Ισχαιμικά έμφρακτα

Η μεγαλύτερη πλειονότητα (80%) των ΑΕΕ οφείλεται σε ισχαιμικά έμφρακτα, λόγω μείωσης ή διακοπής της παροχής αίματος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα (εικόνα 3). Για να τεκμηριωθεί η διάγνωση του ισχαιμικού εμφράκτου θα πρέπει να εκπληρωθεί ένα από τα παρακάτω κριτήρια:

- i. Απεικόνιση υπόπυκνης εστιακής βλάβης στην αξονική τομογραφία εγκεφάλου σε θέση συμβατή με την κλινική εικόνα του ασθενούς.
- ii. Απουσία βλάβης στην αξονική τομογραφία εγκεφάλου και ταυτόχρονα κλινική εικόνα συμβατή με εστιακή, μη αναστρέψιμη νευρολογική σημειολογία αιφνίδιας εγκατάστασης.
- iii. Παρουσία νεκροτομικών ευρημάτων συμβατών με ισχαιμική εγκεφαλική βλάβη

Επίσης στην κατηγορία των ισχαιμικών εμφράκτων ταξινομούνται και περιπτώσεις ΑΕΕ, τα οποία συνοδεύονται από συμβατές βλάβες που απεικονίζονται υπόπυκνες με κεντρική υπέρπυκνη περιοχή στην αξονική τομογραφία εγκεφάλου ή παρουσιάζουν αντίστοιχα νεκροτομικά ευρήματα (αιμορραγική περιοχή εντός ωχράς νεκρωτικής περιοχής). Πρόκειται για τα ισχαιμικά έμφρακτα με αιμορραγική μετατροπή.

Τα ισχαιμικά ΑΕΕ μπορούν να ταξινομηθούν με βάση αιτιοπαθογενετικά κριτήρια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και στη μελέτη TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, Adams και συνεργάτες 1993) στους ακόλουθους τύπους:

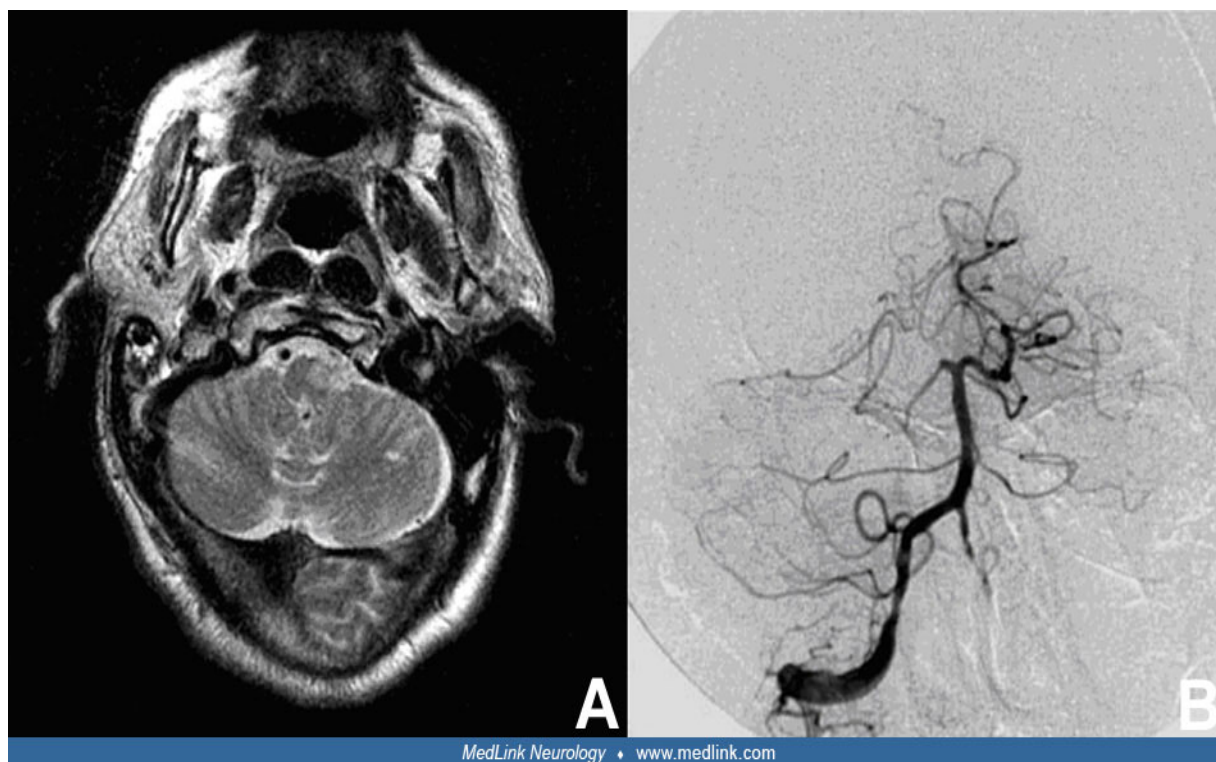
3.4.1 Αθηροθρομβωτικά ΑΕΕ (Αθηροσκλήρωση μεγάλων αγγείων)

Τα αθηροθρομβωτικά ΑΕΕ αποτελούν συνέπεια αθηρωμάτωσης των μεγάλου και μέσου εύρους αρτηριών του εγκεφάλου. Υπόστρωμα της αθηρωματικής νόσου είναι η αθηρωματική πλάκα, η οποία αποτελεί σημείο σχηματισμού θρόμβων. Οι τελευταίοι προκαλούν σταδιακή στένωση του αυλού των αγγείων και οδηγούν ως και στην πλήρη απόφραξη αυτών. Δύο είναι οι υποκείμενοι αιτιοπαθογενετικοί μηχανισμοί εκδήλωσης ΑΕΕ σε ασθενείς με αθηρωμάτωση των μεγάλων και μέσου εύρους αρτηριών του εγκεφάλου:

1. Η χαμηλή παροχή αίματος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα λόγω της αιμοδυναμικά σημαντικής στένωσης της προσβεβλημένης αρτηρίας, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ισχαιμικών εμφράκτων στις μεθόριες ζώνες κατανομής των εγκεφαλικών αρτηριών.
2. Η αρτηριοαρτηριακή εμβολή, όπου έμβολα αγγειογενούς προέλευσης προέρχονται από θρόμβους που έχουν αναπτυχθεί, λόγω αθηρωματικής νόσου,

στο τοίχωμα μεγάλων αγγείων (κυρίως κοινή και έσω καρωτίδα). Τμήματα των θρόμβων αυτών είναι δυνατόν να αποσπαστούν και να αποφράζουν μικρότερους, περιφερικότερους αρτηριακούς κλάδους. Σε άλλες περιπτώσεις, το έμβολο αποτελείται από συσσωρευμένα αιμοπετάλια.

Για την τεκμηρίωση της διάγνωσης των αθηροθρομβωτικών ΑΕΕ θεωρείται απαραίτητη η διενέργεια υπερηχογραφήματος, ψηφιακής ενδαρτηριακής ή μαγνητικής αγγειογραφίας για την απεικόνιση των αγγείων του τραχήλου. Από τις εξετάσεις αυτές καταδεικνύεται απόφραξη ή στένωση $\geq 50\%$ του αυλού του σύστοιχου μεγάλου αγγείου που αρδεύει την περιοχή του εμφράκτου. Είναι επιπλέον εφικτή η διαπίστωση τυχόν ύπαρξης συνοδού εξέλκωσης ($\geq 2\text{mm}$) της αθηρωματικής πλάκας. Στα αντίστοιχα πεδία άρδευσης των μεγάλων εγκεφαλικών αρτηριών ή στις μεθόριες ζώνες κατανομής αυτών διαπιστώνονται απεικονιστικά με τη βοήθεια της αξονικής ή της μαγνητικής τομογραφίας χαμηλής πυκνότητας ή έντασης σήματος ισχαιμικές βλάβες διαμέτρου $\geq 2\text{cm}$. Σε ό,τι αφορά τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με αθηροθρομβωτικού τύπου ΑΕΕ αξίζει να επισημανθεί το ιστορικό παλαιού παροδικού ισχαιμικού ΑΕΕ από το ίδιο αρτηριακό πεδίο άρδευσης, το ιστορικό στεφανιαίας νόσου, η προοδευτική ή αιφνίδια εγκατάσταση του επεισοδίου, η παρουσία φυσήματος των καρωτίδων, η απουσία μείζονος καρδιακής πηγής εμβόλων και τέλος η απουσία τυπικού κενοχωριώδους κλινικού συνδρόμου.



ΕΙΚΟΝΑ 3

Ισχαιμικό έμφρακτο στο εγκεφαλικό στέλεχος AP (A), στα πλαίσια απόφραξης της AP σπονδυλικής αρτηρίας (B)

3.4.2 Καρδιοεμβολικά ΑΕΕ

Για την τεκμηρίωση της διάγνωσης των καρδιοεμβολικών ΑΕΕ είναι απαραίτητη η παρουσία καρδιακής νόσου που συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιοεμβολικών συμβαμάτων. Οι κυριότερες παθήσεις της κατηγορίας αυτής είναι: (1) η κολπική μαρμαρυγή, (2) ο κολπικός πτερυγισμός, (3) το σύνδρομο νοσούντος φλεβοκόμβου με ή χωρίς συνοδό βαλβιδοπάθεια, (4) η παρουσία προσθετικής βαλβίδας στην αορτή ή τη μιτροειδή, (5) το πρόσθιο έμφραγμα του μυοκαρδίου εντός 6 εβδομάδων πριν την εκδήλωση του ΑΕΕ, (6) η ύπαρξη ανευρύσματος ή ακινητικής περιοχής στο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας, (7) η ύπαρξη τοιχωματικού θρόμβου στις αριστερές καρδιακές κοιλότητες, (8) η ιδιοπαθής

διατατική μυοκαρδιοπάθεια, (9) η βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα και (10) η μυξοματώδης πρόπτωση μιτροειδούς σε νεαρά άτομα. Το υπερηχογράφημα των μεγάλων αγγείων του τραχήλου δεν αναδεικνύει σημαντικού βαθμού στενώσεις (στένωση $\geq 50\%$ ή απόφραξη του αυλού). Απεικονιστικά περιγράφεται, αντίστοιχα προς την κατανομή μιας ή περισσότερων εγκεφαλικών αρτηριών ή κυρίων κλάδων τους, η παρουσία ενός ή περισσότερων εμφράκτων με ή χωρίς συνοδό αιμορραγική μετατροπή. Από τα κλινικά στοιχεία χαρακτηριστικά είναι η αιφνίδια εγκατάσταση σοβαρής νευρολογικής βλάβης, η απουσία προηγούμενου παροδικού ΑΕΕ, και η διαταραχή του επιπέδου συνείδησης κατά την εγκατάσταση του επεισοδίου.

3.4.3 Κενοχωριώδη έμφρακτα (απόφραξη μικρών αγγείων)

Το υποκείμενο παθοφυσιολογικό αίτιο εκδήλωσης των κενοχωριωδών εμφράκτων είναι η λιποϋαλίνωση, η οποία παρατηρείται κατά κανόνα στους διατιτραίνοντες τελικούς κλάδους της μέσης εγκεφαλικής και της βασικής αρτηρίας ασθενών με ιστορικό χρόνιας αρτηριακής υπέρτασης και σακχαρώδους διαβήτη. Χαρακτηρίζεται από πάχυνση, ινιδώδη εκφύλιση και νέκρωση του τοιχώματος των τελικών αρτηριολίων, που με τη σειρά τους προκαλούν την απόφραξη του αρτηριακού αυλού και την εκδήλωση των τυπικών κενοχωριωδών ισχαιμικών εμφράκτων (lacunes). Για την τεκμηρίωση της διάγνωσης κενοχωριωδών ΑΕΕ είναι αναγκαία η εκπλήρωση και των δύο ακόλουθων κριτηρίων:

- i. Υπερηχογραφικά ή αγγειογραφικά τεκμηριωμένη απουσία αιμοδυναμικά σημαντικής στένωσης (στένωση $> 50\%$ ή απόφραξη του αυλού) των εγκεφαλικών αρτηριών μεγάλου ή μεσαίου μεγέθους.
- ii. Παρουσία μικρού εμφράκτου (διάμετρος $\leq 2\text{cm}$) στην περιοχή κατανομής διατιτραίνουσας εν τω βάθει αρτηρίας, απεικονισμένου με τη βοήθεια αξονικής

ή μαγνητικής τομογραφίας εγκεφάλου σε θέση συμβατή με την κλινική εικόνα του ασθενούς. Σε περίπτωση φυσιολογικής αξονικής τομογραφίας εγκεφάλου η κλινική εικόνα του ασθενούς θα πρέπει να είναι συμβατή με ισχαιμικό ΑΕΕ.

Από τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς το ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης ή σακχαρώδους διαβήτη συνηγορούν στη διάγνωση κενοχωριώδους ισχαιμικού ΑΕΕ. Επιπλέον στα κενοχωριώδη έμφρακτα παρατηρείται κατά κανόνα νευρολογική σημειολογία συμβατή με:

1. μεμονωμένη κινητική συνδρομή (pure motor stroke).
2. μεμονωμένη αισθητική συνδρομή (pure sensory stroke).
3. αισθητικοκινητική συνδρομή (sensorimotor stroke).
4. αταξική ημιπάρεση (ataxic hemiparesis).
5. δυσαρθρίας και δυσχρησίας της άκρας χείρας (dysarthria-clumsy hand syndrome).

Σημαντική για την τεκμηρίωση της διάγνωσης των κενοχωριωδών εμφράκτων είναι τέλος η απουσία άλλης προφανούς αιτίας μικροαγγειοπάθειας (αγγειίτιδα, χρήση αμφεταμινών, σύνδρομο υπερπηκτικότητας). (εικόνα 4)



ΕΙΚΟΝΑ 4

Μαγνητική τομογραφία: κενοχωριώδης έμφρακτο περίξ των βασικών γαγγλίων ΔΕ

3.4.4 Έμφρακτα αδιευκρίνιστης αιτιολογίας (κρυπτογενή)

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται τα ισχαιμικά έμφρακτα των οποίων: 1) ο αιτιοπαθογενετικός μηχανισμός δεν είναι δυνατό να αποσαφηνιστεί παρά τον ενδελεχή εργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο, 2) ο έλεγχος δεν ήταν ολοκληρωμένος και 3) βρέθηκαν 2 ή περισσότερες αιτιολογίες για την εμφάνιση του ΑΕΕ.

3.4.5 Έμφρακτα άλλης αιτιολογίας

Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει ασθενείς με σπάνιας αιτιολογίας ΑΕΕ, όπως: μη αθηροσκληρωτικές αγγειοπάθειες, καταστάσεις υπερπηκτικότητας ή αιματολογικές διαταραχές.

4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΙΣΧΑΙΜΙΚΑ ΑΕΕ

Μη τροποποιήσιμοι

- Φύλο
- Ηλικία
- Κληρονομικότητα
- Φυλή

Τροποποιήσιμοι

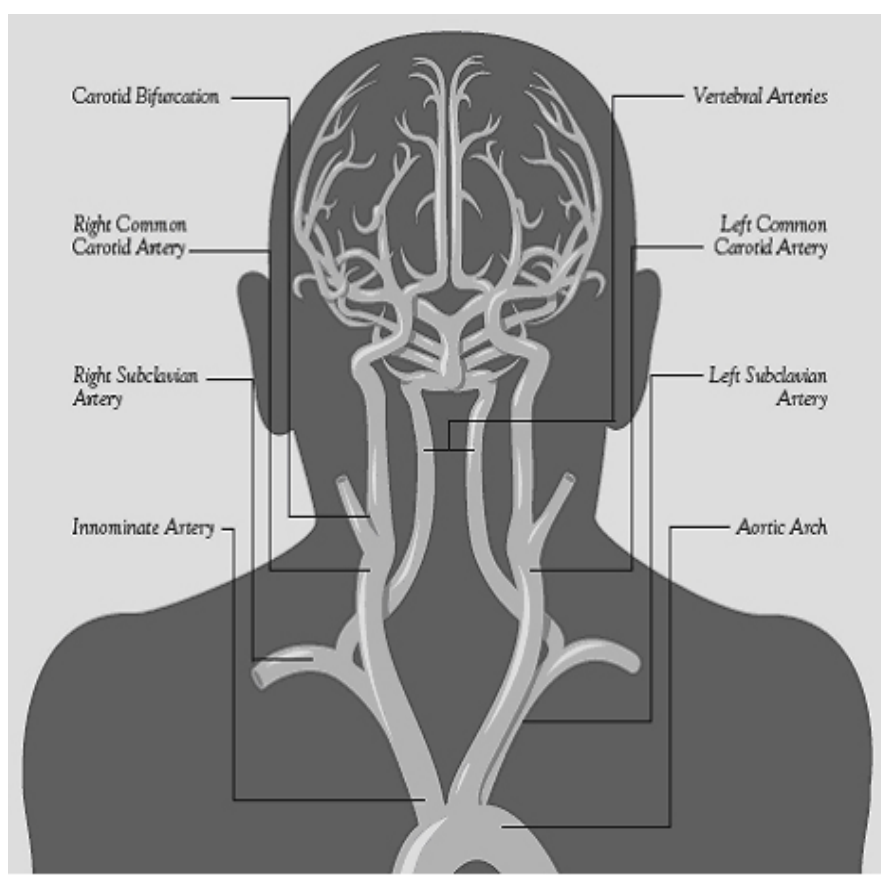
- Αρτηριακή υπέρταση
- Κάπνισμα
- Σακχαρώδης Διαβήτης
- Καρδιοπάθεια: κολπική μαρμαρυγή, έμφραγμα μυοκαρδίου, ρευματική βαλβιδοπάθεια, ενδοκαρδίτιδα
- Υπερλιπιδαιμία
- Λήψη οιστρογόνων
- Κατάχρηση οινοπνεύματος
- Προηγούμενο ΑΕΕ
- Ομοκυστιναιμία

- Διαταραχές πήκτικότητας
- Αιματολογικά νοσήματα: δρεπανοκυτταρική αναιμία, πολυκυτταραιμία
- Αγγειίτιδες: οξώδης πολυαρθρίτις, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος
- Διαχωρισμός Έσω Καρωτίδας
- Παχυσαρκία - Έλλειψη άσκησης
- Χρήση τοξικών ουσιών

5. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ **ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΑΙΜΑΤΩΣΗ**

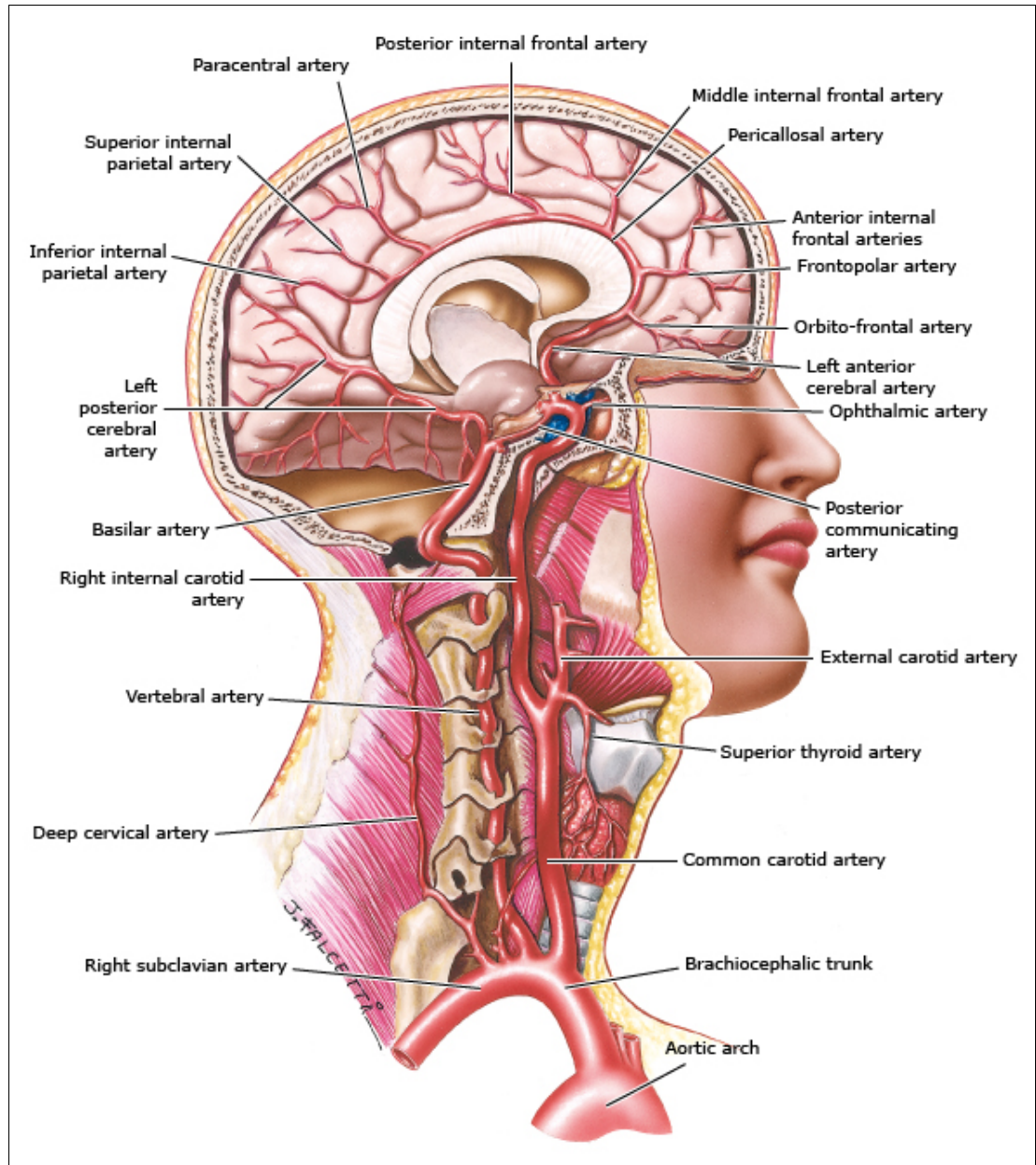
Ο εγκέφαλος αιματώνεται κατά τα 2/3 από κλάδους της Έσω Καρωτίδας (Καρωτιδικό Σύστημα) και κατά το 1/3 από κλάδους του Σπονδυλοβασικού συστήματος. Τα δύο συστήματα αναστομώνονται (κύκλος του Willis). (εικόνα 5 α,β)

ΕΙΚΟΝΑ 5α



ΕΙΚΟΝΑ 5β

Απλή σχηματική αναπαράσταση των εξωκράνιων-ενδοκράνιων αγγείων



Πλάγια όψη των καρωτιδικών αρτηριών, σπονδυλικών αρτηριών, καθώς και των ενδοκράνιων αγγείων.

5.1 ΚΑΡΩΤΙΔΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η Έσω Καρωτίδα είναι κλάδος της Κοινής Καρωτίδας που προέρχεται η μεν Δεξιά από την Ανώνυμη αρτηρία και η Αριστερή από την Αορτή. Η Κοινή Καρωτίδα στο ύψος της γωνίας της κάτω γνάθου διχάζεται στους δύο τελικούς κλάδους της, την Έσω και την Έξω Καρωτίδα. Η Έξω Καρωτίδα αρδεύει το προσωπικό κρανίο και η Έσω Καρωτίδα τον εγκέφαλο.

Η Έσω Καρωτίδα χορηγεί τους εξής κλάδους: την οφθαλμική αρτηρία, την οπίσθια αναστομωτική αρτηρία (ΟΑΑ), και την πρόσθια χοριοειδή αρτηρία. Τέλος, δίνει τους δύο τελικούς της κλάδους, την πρόσθια εγκεφαλική αρτηρία (ΠΕΑ) και τη μέση εγκεφαλική αρτηρία (ΜΕΑ). Η ΜΕΑ έχει διπλάσια αιματική ροή από την ΠΕΑ. Η **Πρόσθια χοριοειδής αρτηρία** αιματώνει το χοριοειδές πλέγμα του κροταφικού κέρατος, την οπτική ταινία, το οπίσθιο σκέλος της έσω κάψας, το έσω τμήμα της ωχράς σφαίρας, την αμυγδαλή, τα πρόσθια τμήματα του ιπποκάμπου, τον υποθάλαμο, τη μέλαινα ουσία, τον ερυθρό πυρήνα και το έξω γονατώδες σώμα.

Η **Μέση εγκεφαλική αρτηρία (ΜΕΑ)** αποτελεί την κύρια συνέχεια της Έσω Καρωτίδας και αιματώνει το μεγαλύτερο μέρος των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Οι κλάδοι της διακρίνονται σε:

-**Ανιόντες**: είναι φλοιώδεις και αιματώνουν την έξω επιφάνεια του μετωπιαίου και βρεγματικού λοβού. Οι περιοχές αυτές ελέγχουν την κινητικότητα και την αισθητικότητα του αντίπλευρου προσώπου και άνω άκρου καθώς και την περιοχή εκπομπής του λόγου (προκειμένου για το επικρατές ημισφαίριο).

-**Κατιόντες**: είναι φλοιώδεις και αιματώνουν την οπτική ακτινοβολία και το κέντρο κατανόησης του λόγου (προκειμένου για το επικρατές ημισφαίριο). Σε βλάβη του μη επικρατούς ημισφαιρίου παρατηρείται αγνωσία (προσωποαγνωσία,

σωματοαγνωσία, νοσοαγνωσία, αγνωσία χώρου) και απραξία (απραξία ένδυσης, κατασκευαστική απραξία).

Διατιτραίνοντες κλάδοι: αιματώνουν τα βασικά γάγγλια και μέρος της έσω κάψας. Σε απόφραξη αυτών των κλάδων παρατηρείται αντίπλευρη ημιπληγία με ομότιμη προσβολή άνω και κάτω άκρου και προσβολή κινητικότητας του αντίπλευρου κάτω ήμισυ του προσώπου.

Η Πρόσθια εγκεφαλική αρτηρία (ΠΕΑ) έχει δύο πεδία άρδευσης, το επιπολής και το εν τω βάθει. Το επιπολής αιματώνει το άνω χείλος και την έσω επιφάνεια του μετωπιαίου και βρεγματικού λοβού, τα πρόσθια 4/5 του μεσολόβιου, το διαφανές διάφραγμα και το λευκό σύνδεσμο. Οι περιοχές αυτές ελέγχουν κινητικά και αισθητικά το αντίπλευρο κάτω άκρο, καθώς και τη λειτουργία της ουροδόχου κύστης και του εντέρου. Το εν τω βάθει δίκτυο (αρτηρία του Heubner) περιλαμβάνει την κεφαλή του κερκοφόρου και το φακοειδή πυρήνα, τον πρόσθιο υποθάλαμο και το πρόσθιο σκέλος της έσω κάψας.

5.2 ΣΠΟΝΔΥΛΟΒΑΣΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Οι δύο σπονδυλικές αρτηρίες προέρχονται από τις αντίστοιχες υποκλείδιες αρτηρίες και ενώνονται στην κάτω επιφάνεια του στελέχους, στο ύψος της γεφυροπρομηκικής αύλακας, προκειμένου να σχηματισθεί η βασική αρτηρία. Η βασική αρτηρία διχάζεται στις δύο Οπίσθιες Εγκεφαλικές Αρτηρίες (ΟΕΑ).

Η Σπονδυλική αρτηρία αιματώνει κυρίως τον προμήκη. Χορηγεί επίσης την πρόσθια νωτιαία αρτηρία που αιματώνει τα πρόσθια 2/3 της αυχενικής μοίρας του νωτιαίου μυελού και την οπίσθια κάτω παρεγκεφαλιδική αρτηρία.

Η Βασική αρτηρία χορηγεί κλάδους για την αιμάτωση της γέφυρας και τη μέση και άνω παρεγκεφαλιδική αρτηρία για την αιμάτωση της παρεγκεφαλίδας.

Η **Οπίσθια εγκεφαλική αρτηρία (ΟΕΑ)** αιματώνει τον ινιακό λοβό (με εξαίρεση την πληκτραία σχισμή), την κάτω-έσω επιφάνεια του κροταφικού λοβού, το μέσο εγκέφαλο, το θάλαμο και τον οπίσθιο υποθάλαμο.

5.3 ΑΝΑΣΤΟΜΩΣΕΙΣ

Κύκλος του Willis.

Οι δύο ΠΕΑ αναστομώνονται μέσω της Πρόσθιας Αναστομωτικής Αρτηρίας (ΠΑΑ) και οι δύο ΟΕΑ αναστομώνονται μέσω της Οπίσθιας Αναστομωτικής Αρτηρίας (ΟΑΑ). Ο κύκλος του Willis επιτρέπει την κυκλοφορική επικοινωνία μεταξύ των δύο ημισφαιρίων και μεταξύ των δύο συστημάτων δηλαδή:

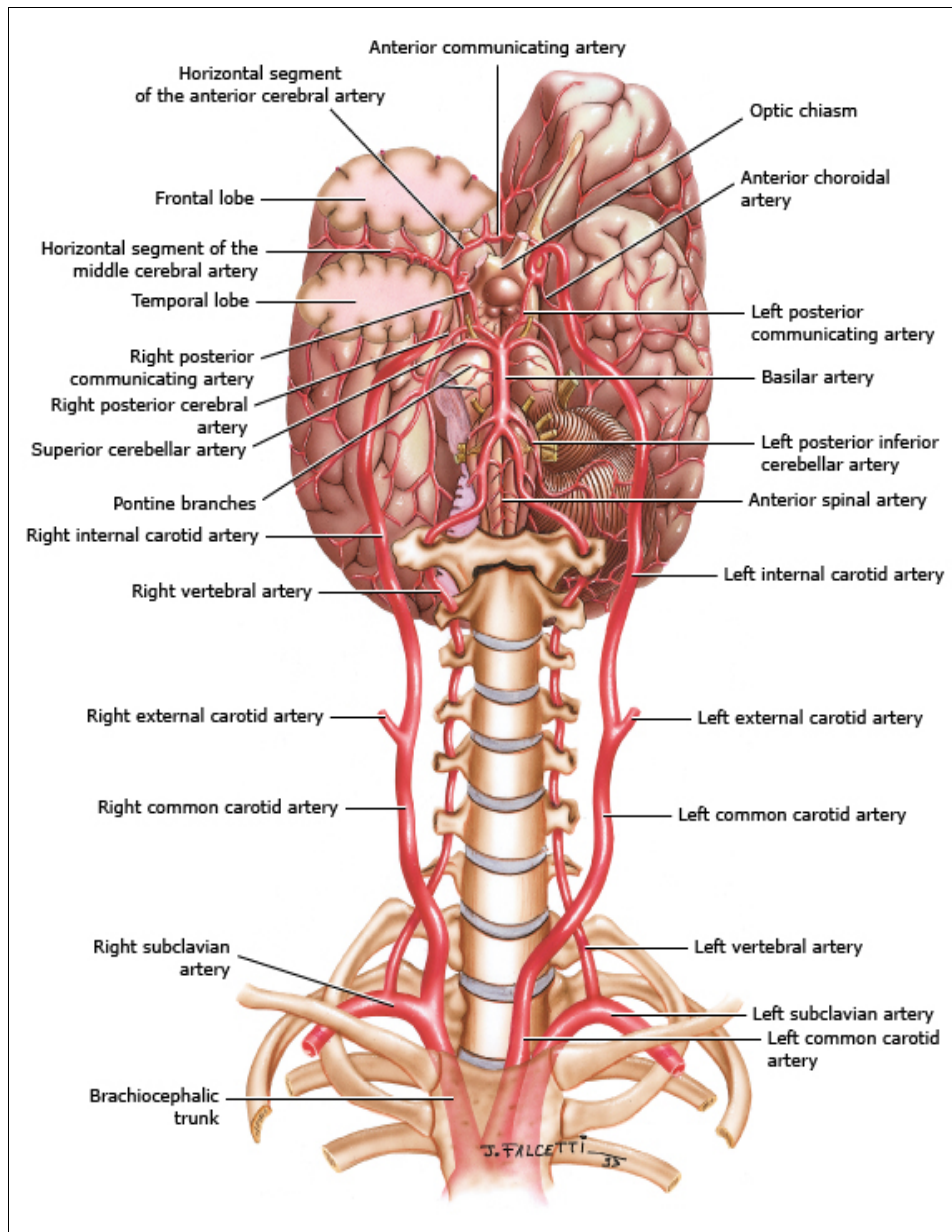
α) Αναστόμωση οφθαλμικής αρτηρίας με την προσωπική αρτηρία.

Επιτρέπει την κυκλοφορική επικοινωνία μεταξύ Έσω και Έξω Καρωτίδας.

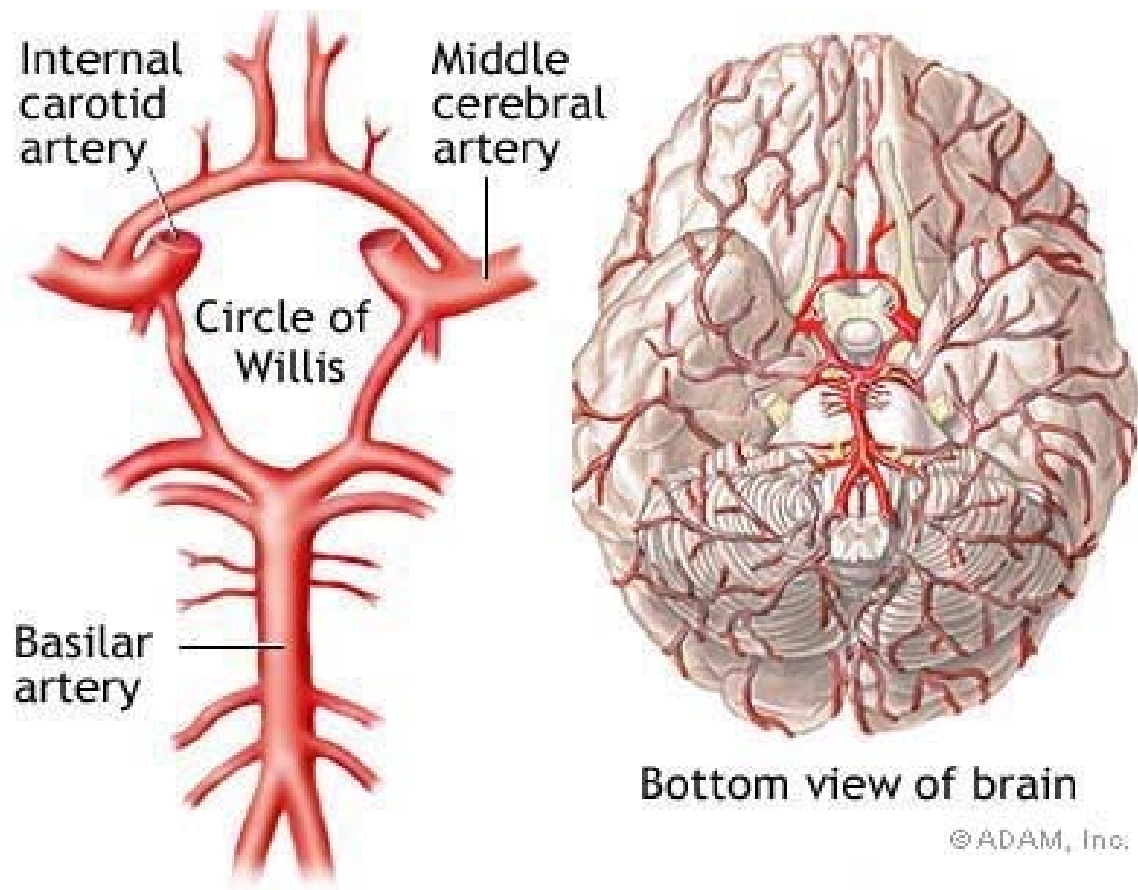
β) Τελικο-τελικές αναστομώσεις

Στην επιφάνεια των ημισφαιρίων μεταξύ κλάδων προερχόμενων από διαφορετικές αρτηρίες, π.χ. μεταξύ των επιπολής κλάδων της ΜΕΑ και της ΠΕΑ

(εικόνα 6 α,β)



ΕΙΚΟΝΑ 6^α: Πρόσθια όψη των καρωτίδων, σπονδυλικών καθώς και των ενδοκράνιων αγγείων και η επικοινωνία μεταξύ τους μέσω του κύκλου του Willis



ΕΙΚΟΝΑ 6β: Ο κύκλος του Willis και η ανατομική του σχέση με τον εγκέφαλο.

6. ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΣΤΑ

ΠΛΑΙΣΙΑ ΒΛΑΒΗΣ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

1. Κοινή και Έσω Καρωτίδα

Η κλινική εικόνα ποικίλει πολύ. Μπορεί η πλήρης απόφραξη να διατρέχει ασυμπτωματικά εφόσον υπάρχει ικανό παράπλευρο δίκτυο ή να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατο λόγω εκτεταμένου εμφράκτου και συνοδού εγκεφαλικού οιδήματος. Μπορεί επίσης τα συμπτώματα να είναι παροδικά, συνηθέστερα θάμβος όρασης με ή και χωρίς συνοδό αδυναμία άκρου. Η συμπτωματολογία αντανακλά ουσιαστικά αυτήν της ΜΕΑ που αποτελεί και τη φυσική συνέχεια της Έσω Καρωτίδας: αντίπλευρη μυϊκή αδυναμία πυραμιδικού τύπου αφορώσα κυρίως στο πρόσωπο και στο άνω άκρο, αντίπλευρη διαταραχή αισθητικότητας, ομώνυμη ημιανοψία ή μονόπλευρη απώλεια όρασης και, εφόσον η διαταραχή αφορά το επικρατές ημισφαίριο, αφασία.

2. Μέση εγκεφαλική αρτηρία (ΜΕΑ)

Καθολική απόφραξη.

Οφείλεται συνήθως σε εμβολή στο αρχικό τμήμα της αρτηρίας. Ο ασθενής μπορεί να εμφανίζει επηρεασμένο επίπεδο συνείδησης, με αντίπλευρο ημιπληγία με συμμετοχή και του αντίπλευρου κάτω ημίσεως του προσώπου, ημιαναισθησία και ημιανοψία. Σε βλάβη του επικρατούς ημισφαιρίου παρατηρείται αφασία εκπομπής και κατανόησης ενώ σε βλάβες του μη επικρατούντος ημισφαιρίου παρατηρείται ημισωματοαγνωσία και νοσοαγνωσία.

Απόφραξη ανιόντων κλάδων.

Παρατηρείται παράλυση και υπαισθησία αντίπλευρου άνω άκρου και προσώπου (κινητικά επηρεάζεται μόνο το κατώτερο τμήμα του προσώπου). Σε προσβολή του επικρατούς ημισφαιρίου παρατηρείται αφασία εκπομπής.

Απόφραξη κατιόντων κλάδων.

Παρατηρείται αντίπλευρος ομώνυμη ημιανοψία και αφασία κατανόησης (προκειμένου για το επικρατές ημισφαίριο). Σε βλάβη του μη επικρατούς ημισφαιρίου παρατηρείται αγνωσία (προσωποαγνωσία, νοσοαγνωσία, σωματοαγνωσία, αγνωσία χώρου) και απραξία (απραξία ένδυσης, κατασκευαστική απραξία).

Απόφραξη διατितραινόντων κλάδων. Παρατηρείται αντίπλευρη ημιπληγία με ισότιμη προσβολή του άνω και κάτω άκρου και προβολή κινητικότητας κατώτερου ημίσεως προσώπου, από προσβολή της έσω κάψας. Δεδομένου ότι δεν προσβάλλεται ο φλοιός δεν παρατηρούνται διαταραχές του λόγου ή άλλων ανώτερων λειτουργιών.

3. Πρόσθια εγκεφαλική αρτηρία (ΠΕΑ)

Αν το αγγείο αποφραχθεί πριν την έκφυση της πρόσθιας αναστομωτικής αρτηρίας τότε δεν παρατηρείται κλινική συμπτωματολογία λόγω ικανού παράπλευρου αναστομωτικού δικτύου. Σε απόφραξη περιφερικότερα της πρόσθιας αναστομωτικής αρτηρίας η κλινική εικόνα χαρακτηρίζεται από παράλυση και διαταραχή αισθητικότητας του αντίπλευρου κάτω άκρου, ακράτεια ούρων, διαταραχές συμπεριφοράς (αβουλία, διαταραχή προσοχής).

4. Βασική αρτηρία

Παρατηρείται τετραπληγία και παράλυση του προσώπου από προσβολή των πυραμιδικών δεματίων και των πυρήνων των εγκεφαλικών συζυγιών. Διαταραχές οφθαλμοκινητικότητας: διπλωπία, παράλυση οριζοντίου και καθέτου βλέμματος,

νυσταγμός λόγω προσβολής οφθαλμοκινητικών κέντρων. Διαταραχές οπτικού πεδίου ως τύφλωση από ισχαιμία ινιακού λοβού. Αμφοτερόπλευρη παρεγκεφαλιδική αταξία λόγω προσβολής παραγκεφαλικών σκελών. Διαταραχή αισθητικότητας από προσβολή των αισθητικών οδών (νωτιαιοθαλαμικά δεμάτια, έσω λημνίσκος) και του θαλάμου. Τέλος, ο ασθενής μπορεί να περιέλθει σε κώμα από προσβολή του ανιόντος δικτυωτού σχηματισμού

5. Παροδικά ισχαιμικά επεισόδια

Ο μηχανισμός εμφάνισης παροδικού ΑΕΕ είναι αντίστοιχος με αυτόν των εγκατεστημένων, δηλαδή είτε μειωμένη αιματική παροχή, π.χ. μετά από πτώση της αρτηριακής πίεσης ή από αρρυθμία, είτε απόφραξη αγγείου από εμβολή. Η πτώση της αιματικής παροχής σε επίπεδα 20-30ml/100gr/min είναι ικανή να προκαλέσει νευρολογικά συμπτώματα. Η σύντομη αποκατάσταση της αιματικής ροής οδηγεί και στην πλήρη αποκατάσταση της κλινικής εικόνας χωρίς κατάλοιπα και χωρίς απεικόνιση εμφράκτου. Η κλινική εικόνα εξαρτάται από την εντόπιση της ισχαιμίας. Αν η ισχαιμία αφορά στο *καρωτιδικό σύστημα* τότε παρατηρούνται: θάμβος όρασης, αμαύρωση οφθαλμού, ομώνυμη ημιανοψία, διαταραχές λόγου (αφασία), κινητικές διαταραχές (ημιπάρεση, μονοπάρεση), αισθητικές διαταραχές (υπαισθησία, αιμωδίες αφορώσες το ήμισυ του σώματος ή και μόνο μέρος άκρου). Αν η ισχαιμία αφορά στο *σπονδυλοβασικό σύστημα* παρατηρούνται ζάλη, ίλιγγος, δυσαρθρία, διαταραχή ισορροπίας, αταξία, διπλωπία, δυσκαταποσία, διαταραχή επιπέδου συνείδησης και σπανιότερα ημιπάρεση, ημιυπαισθησία και ημιανοψία. Τα παροδικά ΑΕΕ είναι προειδοποιητικά επερχόμενου ΑΕΕ. Κάθε έτος μετά από παροδικό ΑΕΕ ο κίνδυνος εμφάνισης εγκατεστημένου ΑΕΕ είναι 5-10% με μεγαλύτερη πιθανότητα τους πρώτους 3-6 μήνες. Πιο ειδικά το 10% των ασθενών θα εγκαταστήσουν ΑΕΕ εντός

90 ημερών από το παροδικό και μάλιστα οι μισοί από αυτούς εντός των πρώτων 2 ημερών.

6. Κενοτοπιώδη έμφρακτα

Έχουν μέγεθος 2-20 mm. Οφείλονται σε απόφραξη εν τω βάθει διατρηαινόντων κλάδων και είναι υποφλοιώδη, στην περικοιλιακή λευκή ουσία, τα βασικά γάγγλια, τη γέφυρα και την παρεγκεφαλίδα. Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου για τα κενοτοπιώδη έμφρακτα είναι η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης. Τα πιο συχνά κλινικά σύνδρομα είναι το αμιγώς κινητικό, το αμιγώς αισθητικό, το σύνδρομο δυσαρθρίας/αδεξιότητας χειρός και το σύνδρομο αταξίας/ημιπάρεσης. Πολλαπλά κενοτοπιώδη έμφρακτα δημιουργούν μία ειδική κλινική οντότητα – *état lacunaire*- που χαρακτηρίζεται από αστάθεια βαδίσσεως, υποφλοιώδη άνοια και ψευδοπρομηκική παράλυση (αμφοτερόπλευρη προσβολή φλοιοπρομηκικών συνδέσεων). (Marco Mumenthaler, Heinrich Mattle. Νευρολογία. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 2006, Kenneth Lindsay, Ian Bone. Churchill Livingstone, Neurology and Neurosurgery Illustrated 3rd Edition, 1997, Δημήτρης Βασιλόπουλος. Νευρολογία, Επιτομή θεωρίας και πράξης Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. 2003).

Ακολουθεί σχηματική παράσταση των συνδρόμων που προκύπτουν συνέπεια βλάβης του αγγειακού δικτύου (εικόνα 7)

Lesion	Artery occluded	Infarct, surface	Infarct, coronal section	Clinical manifestations
Entire territory	Anterior cerebral Internal carotid			Contralateral gaze palsy, hemiplegia, hemisensory loss, spatial neglect, hemianopsia Global aphasia (if on left side) May lead to coma secondary to edema
	Superior division Lenticulostriate Medial Lateral Middle cerebral Inferior division			
Deep				Contralateral hemiplegia, hemisensory loss Transcortical motor and/or sensory aphasia (if on left side)
Middle cerebral artery	Parasylvian			Contralateral weakness and sensory loss of face and hand Conduction aphasia, apraxia and Gerstmann's syndrome (if on left side) Constructional dyspraxia (if on right side)
	Superior division			Contralateral hemiplegia, hemisensory loss, gaze palsy, spatial neglect Broca's aphasia (if on left side)
	Inferior division			Contralateral hemianopsia or upper quadrant anopsia Wernicke's aphasia (if on left side) Constructional dyspraxia (if on right side)
Anterior cerebral artery	Entire territory			Incontinence Contralateral hemiplegia Abulia Transcortical motor aphasia or motor and sensory aphasia Left limb dyspraxia
	Distal			Contralateral weakness of leg, hip, foot and shoulder Sensory loss in foot Transcortical motor aphasia or motor and sensory aphasia Left limb dyspraxia

ΕΙΚΟΝΑ 7: Σχηματική παράσταση από αριστερά προς τα δεξιά: 1. Σημείο απόφραξης του αγγείου, 2&3 σημείο του εγκεφάλου με ισχαιμία (σε πλάγια και πρόσθια όψη) και 4. Κλινική συμπτωματολογία ανάλογα του σημείου απόφραξης

7. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ

ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΑΙΜΑΤΩΣΗ

Ο εγκέφαλος έχει ιδιαίτερα μεγάλες ανάγκες σε γλυκόζη και οξυγόνο. Το βάρος του αντιστοιχεί στο 2% του συνολικού βάρους του σώματος αλλά καταναλώνει περίπου το 17% του συνολικού οξυγόνου και γλυκόζης. Είναι απαραίτητο η παροχή αίματος στον εγκέφαλο να παραμένει σταθερή, γύρω στα 55ml/100gr/min, ανεξάρτητη από τις διακυμάνσεις της αρτηριακής πίεσης. Αυτή η *αυτορρύθμιση της εγκεφαλικής κυκλοφορίας* επιτυγχάνεται μέσω φυσικών, βιοχημικών και νευρικών μηχανισμών.

Αυτορρύθμιση εγκεφαλικής κυκλοφορίας

A. *Αρτηριακή πίεση*: οι μεταβολές της αρτηριακής πίεσης προκαλούν μέσω του καρωτιδικού κόλπου σε αυξομειώσεις της διαμέτρου των αγγείων. Ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί για μεταβολές της αρτηριακής πίεσης από 50 έως 200mmHg.

B. CO_2 : Η υπερκαπνία προκαλεί αγγειοδιαστολή και η υποκαπνία αγγειοσύσπαση. Η υπερκαπνία αντανakλά αυξημένο μεταβολισμό και άρα απαιτούνται μεγαλύτερες ποσότητες οξυγόνου και γλυκόζης, δηλαδή αυξημένη αιματική παροχή που επιτυγχάνεται με την αγγειοδιαστολή.

Γ. O_2 : Η υποξαιμία προκαλεί αγγειοδιαστολή προκειμένου να αυξηθεί η αιματική παροχή στον εγκέφαλο.

Δ. pH : Η οξέωση προκαλεί αγγειοδιαστολή προκειμένου να αυξηθεί η αιματική παροχή στον εγκέφαλο. Η επίδραση των μεταβολών του οξυγόνου και του pH είναι ασθενέστερη από αυτήν των μεταβολών του CO_2 .

E. Το *συμπαθητικό αυτόνομο νευρικό σύστημα* προκαλεί αγγειοσύσπαση προστατεύοντας τον εγκέφαλο από τις απότομες διακυμάνσεις της αρτηριακής

πίεσης, ενώ το παρασυμπαθητικό προκαλεί αγγειοδιαστολή, διευκολύνοντας τη ρυθμιστική δράση του CO₂.

ΣΤ. *Γλοιότητα*.: Η αυξημένη γλοιότητα του αίματος, όπως στην πολυερυθραιμία, μειώνει την αιματική παροχή, ενώ η μειωμένη γλοιότητα όπως συμβαίνει στη αναιμία, αυξάνει την παροχή.

Ζ. *Το τοίχωμα των αγγείων*: Η μείωση της διαμέτρου των αγγείων, όπως συμβαίνει στην αθηροσκλήρυνση, προκαλεί αύξηση των αντιστάσεων και μείωση της παροχής.

Η. *Ενδοκράνια πίεση*: Η αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης λόγω όγκου, αποστήματος, οιδήματος ή αποφρακτικού υδροκεφάλου μειώνει την παροχή είτε λόγω αύξησης των αντιστάσεων είτε λόγω αύξησης της φλεβικής πίεσης.

Τα ισχαιμικά επεισόδια οφείλονται είτε σε εμβολή είτε σε θρόμβωση αγγείων, είτε σε μειωμένη εγκεφαλική αιματική ροή. Οποιαδήποτε κι αν είναι η αιτία της ισχαιμίας, οδηγεί σε θάνατο τους νευρώνες λόγω ανεπαρκούς παροχής οξυγόνου και γλυκόζης, δημιουργώντας ένα έμφρακτο.

Τα έμφρακτα με βάση παθολογοανατομικά κριτήρια διακρίνονται σε:

1. Περιοχικά. Απαντώνται στο φλοιό και την υποφλοιώδη λευκή ουσία. Οφείλονται συνήθως σε εμβολικό επεισόδιο ή τοπική απόφραξη κλάδων μεγάλων αγγείων (μακροαγγειοπάθεια)
2. Μεθοριακά. Συμβαίνουν στη μεθόριο μεταξύ δύο περιοχών αιμάτωσης από δύο ή περισσότερα αγγεία. Παρατηρούνται όταν η παροχή ενός αγγείου είναι ανεπαρκής, συνήθως λόγω πτώσης αρτηριακής πίεσης και η παράπλευρη κυκλοφορία αδυνατεί να αντισταθμίσει.
3. Κενοτοπιώδη. Οφείλονται σε διαταραχές αιμάτωσης από μικρής διαμέτρου αγγεία και έχουν μέγεθος <2 cm.

Ισχαιμικός καταρράκτης

Μετά την απόφραξη ενός αγγείου, η ισχαιμούσα περιοχή υφίσταται μία σειρά από αλλοιώσεις που καταλήγουν τελικά στη νέκρωση του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την απόφραξη του αγγείου ως την έναρξή της νέκρωσης καλείται *θεραπευτικό παράθυρο* και διαρκεί 10-12 λεπτά. Η περιοχή που ισχαιμεί εμφανίζει μία κεντρική ζώνη, όπου παρατηρείται νέκρωση νευρώνων, νευρογλοίας, και ενδοθηλίου αγγείων, και μία περιφερική ζώνη που διατηρεί μερική αιμάτωση από παράπλευρη κυκλοφορία. Στην περιφερική αυτή ζώνη, που ονομάζεται *λυκοφωτική (penumbra)*, τα νευρικά κύτταρα υπολειπονται και μπορεί να επιβιώσουν για 3-4 ώρες. Με το πέρασμα του χρόνου τα όρια της κεντρικής περιοχής διευρύνονται ενώ αντίστοιχα τα όρια της περιφερικής περιορίζονται, και μαζί με αυτά και το ποσοστό των νευρώνων που θα επιβιώσει. Συμπτώματα ισχαιμίας παρατηρούνται όταν η εγκεφαλική αιματική ροή μειωθεί στα 10ml/100 gr/min. Όταν η εγκεφαλική αιματική ροή είναι μεταξύ 18ml/100gr/min και 10ml/100 gr/min τότε παρατηρούνται δυσλειτουργίες αλλά οι διαταραχές αυτές είναι αντιστρεπτές εφόσον αποκατασταθεί η κυκλοφορία.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η μειωμένη παροχή οξυγόνου και γλυκόζης οδηγεί σε μείωση παραγωγής ATP και αναερόβια γλυκόλυση με συνακόλουθη παραγωγή γαλακτικού οξέος, μεταβολική οξέωση και διαταραχή της διαδικασίας ανταλλαγής ιόντων με ανεξέλεγκτη τελικά είσοδο ιόντων νατρίου και ασβεστίου στα κύτταρα. Η είσοδος νατρίου οδηγεί σε κυτταρικό οίδημα ενώ η είσοδος ασβεστίου επιτρέπει την απελευθέρωση διεγερτικών νευριδιαβιβαστών, όπως το γλουταμικό οξύ που με τη σειρά του ενεργοποιεί τους NMDA (N-methyl-D-Aspartate) και άλλους διεγερτικούς υποδοχείς σε άλλους νευρώνες. Με τη σειρά τους αυτοί οι νευρώνες εκπολώνονται προκαλώντας περαιτέρω είσοδο ιόντων ασβεστίου και άρα περαιτέρω απελευθέρωση

γλουταμικού οξέος πολλαπλασιάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο το αρχικό αποτέλεσμα της ισχαιμίας. Επιπλέον, το ασβέστιο ενεργοποιεί διάφορα λυτικά ένζυμα που οδηγούν σε καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων. Σε όλη αυτήν τη διαδικασία παράγονται και ελεύθερες ρίζες, νιτρικά οξέα και αραχιδονικό οξύ που επιπρόσθετα καταστρέφουν τα νευρικά κύτταρα.

Ο κεντρικός στόχος της θεραπείας στα ισχαιμικά ΑΕΕ είναι να διατηρηθεί η περιοχή της ολιγαιμίας, η λυκοφωτική περιοχή, είτε αποκαθιστώντας σύντομα την αιματική ροή είτε μειώνοντας τα αποτελέσματα της ισχαιμικής βλάβης χορηγώντας νευροπροστατευτικούς παράγοντες που αναστέλλουν τον καταρράκτη της ισχαιμίας (πχ ανταγωνιστές γλουταμικού οξέος, δεσμευτές των ιόντων ασβεστίου). (Marco Mumenthaler και συνεργάτες 2006, Kenneth Lindsay και συνεργάτες 1997, Δημήτρης Βασιλόπουλος 2003).

8. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ

Τα αιμοφόρα αγγεία έχουν μια σειρά δομικών χαρακτηριστικών και αποτελούνται από τρεις στιβάδες: (εικόνα 8)

Εσωτερικός χιτώνας (ενδοθήλιο): Αποτελείται από στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που επενδύουν την εσωτερική επιφάνεια του αγγείου. Αυτά τα κύτταρα εφάπτονται σε ένα βασικό υμένα και ανανεώνονται σε ποσοστό 1% την ημέρα. Κάτω από το ενδοθήλιο βρίσκεται η υποενδοθηλιακή στοιβάδα, η οποία αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό και μπορεί να περιέχει λεία μυϊκά κύτταρα. Τόσο οι ίνες του συνδετικού ιστού, όσο και τα λεία μυϊκά κύτταρα τείνουν να διαταχθούν κατά τον επιμήκη άξονα. Η έσω ελαστική μεμβράνη διαχωρίζει τον έσω από το μέσο χιτώνα. Η

μεμβράνη αυτή παρουσιάζει χάσματα τα οποία επιτρέπουν τη διόδο μακρομοριακών ουσιών από το αίμα στους ιστούς (Junqueira και συνεργάτες 1997).

Μέσος χιτώνας: Ο μέσος χιτώνας αποτελείται από στιβάδες λείων μυϊκών κυττάρων με ελικοειδή διάταξη, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται ίνες κολλαγόνου, ελαστικές ίνες και πρωτεογλυκάνες, η ποσότητα των οποίων εξαρτάται από τον τύπο του αγγείου. Στις ελαστικές αρτηρίες προεξάρχουν οι ελαστικές ίνες και ο μέσος χιτώνας αποτελεί τον παχύτερο χιτώνα, ενώ στις μέσου τύπου αρτηρίες και τα αρτηριόλια είναι πολύ περισσότερες οι μυϊκές ίνες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν υπάρχουν ινοβλάστες, αλλά οι ίνες παράγονται από τα λεία μυϊκά κύτταρα.. Ο μέσος χιτώνας διαχωρίζεται από τον έξω με την έξω ελαστική μεμβράνη (Junqueira και συνεργάτες 1997).

Εξωτερικός χιτώνας: Αποτελείται από συνδετικό ιστό, κυρίως ίνες κολλαγόνου τύπου Ι και ελαστικές ίνες. Οι ίνες είναι προσανατολισμένες κατά τον επιμήκη άξονα. Οι ίνες κολλαγόνου εμποδίζουν τη διάταση του τοιχώματος πέρα από τα φυσιολογικά όρια κατά τη συστολή. Τα κύτταρα στο τοίχωμα αυτό είναι ινοβλάστες και μακροφάγα. Αυτή η στοιβάδα μεταπίπτει στον περιβάλλοντα ιστό του οργάνου που αιματώνει το αγγείο. Αιματώνεται από αιμοφόρα αγγεία των αγγείων (vasa vasorum) και νευρώνεται από συμπαθητικές νευρικές απολήξεις (Junqueira και συνεργάτες 1989,1997)

Το Ενδοθήλιο

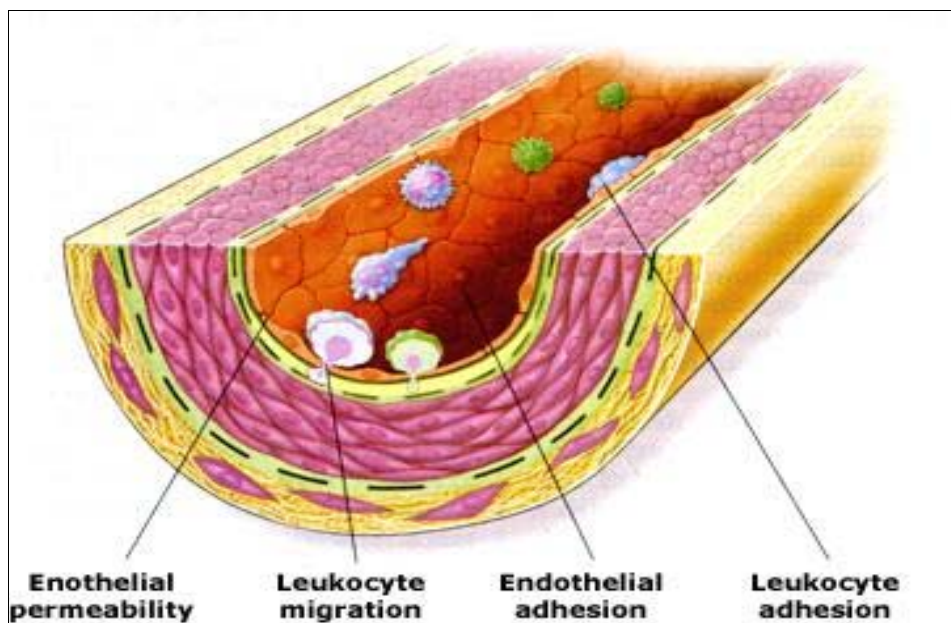
Είχε θεωρηθεί ότι το ενδοθήλιο είναι μία εσωτερική μεμβράνη ανάμεσα στο τοίχωμα του αγγείου και των στοιχείων του αίματος. Όμως τελευταίες εξελίξεις αποδεικνύουν ότι το ενδοθήλιο είναι ένας ενεργός βιολογικός διάμεσος ανάμεσα στο αίμα και τους λοιπούς ιστούς. Ο μοναδικός χιτώνας του ενδοθηλίου που περιέχει δίκτυο αρτηριδίων και φλεβιδίων αποτελεί έναν μοναδικό χιτώνα ιδιαίτερα ανθεκτικό

στον σχηματισμό θρομβώσεων ανάμεσα στο αίμα και στους ιστούς κάτωθεν του ενδοθηλίου. Επίσης το ενδοθήλιο ρυθμίζει τον τόνο, την αιμόσταση και την φλεγμονή δια του κυκλοφορικού συστήματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι μια εκτεταμένη φλεγμονώδης αντίδραση λόγω βλαβών του ενδοθηλίου είναι αρκετή για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.

Εκτός της αθηροσκλήρωσης η δυσλειτουργία ενδοθηλίου παρατηρείται και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως η υπερχοληστεριναιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης η υπέρταση η καρδιακή ανεπάρκεια το κάπνισμα και η ηλικία. Σε κανονικές συνθήκες το ενδοθήλιο είναι υπεύθυνο για την διατήρηση του αγγείου σε διαστολή.

Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου λόγω υπερλιπιδαιμίας είναι το πρώτο βήμα για την αθηροσκλήρωση. Ασθενείς με φυσιολογικά ή λίγο επηρεασμένα στεφανιαία αγγεία όμως με θετικό οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου έχουν παθολογική αυτορύθμιση της ροής των στεφανιαίων αγγείων το οποίο αναπαριστά δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των στεφανιαίων αγγείων σε επίπεδο μικροκυκλοφορίας.

Το θετικό οικογενειακό ιστορικό είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου σε σχέση με τους άλλους παράγοντες. Το ανωτέρω σε συνδυασμό με την υπερχοληστεριναιμία και την ηλικία επιβαρύνει κατά πολύ την λειτουργία του ενδοθηλίου. Σε μια μελέτη νέων ασθενών με στεφανιαία νόσο βρέθηκε ότι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι παρούσα και στα περιφερικά αγγεία με συμπέρασμα ότι πρόκειται για μια διάχυτη διαταραχή (Emile R Mohler και συνεργάτες 2009). (εικόνα 8)



ΕΙΚΟΝΑ 8:

Οι αλλαγές που επισυμβαίνουν στο ενδοθήλιο πριν τον σχηματισμό των βλαβών της αθηροσκλήρωσης, δηλ: αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου στις λιποπρωτεΐνες και σε άλλα προϊόντα του πλάσματος. Το τελευταίο διευκολύνεται από το νιτρικό οξύ, προστακυκλίνη, τον παράγοντα των αιμοπεταλίων την αγγειοτενσίνη II και την ενδοθιλίνη. Σημειώνεται η αύξηση της εναπόθεσης των λευκοκυττάρων συμπεριλαμβανομένου και της L-σελεκτίνης, ιντεγρίνες, το εναποτεθέν μόριο 1 αιμοπεταλίων-ενδοθηλίου, το εναποτεθέν μόριο 1 του κυτταρικού τοιχώματος, η μετανάστευση των λευκοκυττάρων μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα το οποίο υποβοηθείται από την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, την μονοκυτταρική χημοτακτική πρωτεΐνη, την ιντερλευκίνη-8, τον παράγοντα των αιμοπεταλίων και την οστεοποντίνη.

9. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ

ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ

9.1 Ορισμός

Η αθηροσκλήρωση είναι κυρίως πάθηση των μεγάλων αγγείων, η οποία χαρακτηρίζεται από εκφυλιστικές αλλοιώσεις του αρτηριακού τοιχώματος και από μια σειρά διεργασιών που οδηγούν προοδευτικά σε σκλήρυνση των αγγείων, με πιθανά επακόλουθα αφενός τη ρήξη αυτών λόγω μειωμένης ελαστικότητας και αφετέρου τη δημιουργία θρόμβων αίματος με συνέπεια τη θρόμβωση ή την εμβολή.

Για πολλά χρόνια η αθηροσκλήρωση θεωρήθηκε ως μια εκφυλιστική νόσος που οφείλεται στη γήρανση των αρτηριών. Ωστόσο είναι πλέον γνωστό ότι ξεκινά στην εφηβική ηλικία και εξελίσσεται αργά χωρίς να προκαλεί συγκεκριμένα κλινικά σημεία μέχρι την προχωρημένη ηλικία. Η αθηροσκλήρωση εμφανίζεται σχεδόν στο σύνολο του πληθυσμού. Η βαρύτητα των αλλοιώσεων ποικίλει με ως συνέπεια τη διαφορετική επίπτωση της νόσου.

9.2 Παθογένεια της αθηροσκλήρωσης – Θεωρίες

1. Θεωρία του τραυματισμού του ενδοθηλίου του αγγείου

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή η βλάβη του ενδοθηλίου είναι αυτή που οδηγεί στο σχηματισμό του αθηρώματος. Κάθε ένας από τους βασικούς παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης οδηγεί μέσω διαφόρων διεργασιών στη βλάβη και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Η αλληλουχία των μεταβολών που οδηγούν από τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου έως την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη. Σύμφωνα με την επικρατούσα εκδοχή η βλάβη του ενδοθηλίου έχει ως αποτέλεσμα αρχικά την προσκόλληση μονοκυττάρων και T

λεμφοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο και στη συνέχεια την διείσδυση αυτών στον έσω χιτώνα. Αυτή η διεργασία οφείλεται πιθανόν στην αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου που με τη σειρά της αποδίδεται σε τραυματισμό αυτού από διάφορους παράγοντες (Ross και συνεργάτες 1993). Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται τα αυξημένα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα, οι ελεύθερες ρίζες που αποτελούν συνέπεια του καπνίσματος, ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση, η αυξημένη συγκέντρωση ομοκυστεΐνης στο πλάσμα και η σχετική γενετική προδιάθεση. Τα μονοκύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα, και διαπερνώντας τα αραιά συνδεδεμένα κύτταρα του ενδοθηλίου φτάνουν στον υπενδοθηλιακό χώρο όπου και μετατρέπονται σε ενεργοποιημένα μακροφάγα.

2. Θεωρία των μονοκλωνικών αντισωμάτων

Η θεωρία αυτή προτάθηκε από τους Benditt και συνεργάτες (1976) και υποστηρίζει ότι κάθε αθηρωματική πλάκα προέρχεται από ένα αρχέγονο λείο μυϊκό κύτταρο που πολλαπλασιάζεται και αποτελεί την κοινή προέλευση όλων των κυττάρων που απαρτίζουν τη βλάβη. Συνεπώς, κάθε αθηρωματική βλάβη αναπτύσσεται όπως ένας καλοήθης όγκος που προέρχεται από κύτταρο που έχει τροποποιηθεί με την επίδραση διαφόρων παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να είναι διάφοροι ιοί ή βιοχημικοί παράγοντες. Έχει αποδειχτεί από ορισμένους ερευνητές (Sakata και συνεργάτες 1998, Khaw και συνεργάτες 1994) ότι μερικές αθηρωματικές πλάκες που εμφανίζονται σαν μεμονωμένοι όγκοι, περιβαλλόμενες από εστίες φυσιολογικού ιστού, είναι μονοκλωνικής προέλευσης.

3 Θεωρία της φλεγμονής

Τα τελευταία χρόνια διάφορες μελέτες υπέδειξαν τη σημασία της φλεγμονώδους διεργασίας στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης (Buja και συνεργάτες 1996, Scott και συνεργάτες 2002). Μελέτες σε ποντίκια αποκάλυψαν ότι ο παράγοντας διέγερσης των μακροφάγων (M-CSF) που παράγεται από ενδοθηλιακά κύτταρα παίζει σημαντικό ρόλο στη συνάθροιση και πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων και ιστικών μακροφάγων, τα οποία όπως έχει αποδειχθεί αποτελούν τα κυρίαρχα κύτταρα στο εσωτερικό της πλάκας (Qiao και συνεργάτες 1997). Αυτή η διαπίστωση έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών στις λοιμώξεις και τον πιθανό ρόλο τους ως παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος. Ωστόσο δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί κατά πόσο υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση ή εάν τα μικρόβια απλώς αποικίζουν την αθηρωματική πλάκα χωρίς να προκαλούν περαιτέρω εξέλιξη της.

Οι παραπάνω διεργασίες συνοδεύονται από δραστηριοποίηση του ανοσολογικού συστήματος, η οποία εκφράζεται από βιολογικά δραστικά μόρια. Πιο συγκεκριμένα οι κυτταροκίνες αποτελούν γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται από ποικιλία κυττάρων (μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα) και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Η σύνθεση τους είναι ουσιαστικά η αντίδραση του οργανισμού προς κάποιο εξωτερικό ερέθισμα (αντιγόνο). Λοιμώξεις ή άλλες κυτταροκίνες μπορούν να πυροδοτήσουν αυτή την αντίδραση. Δεν αποτελούν όμως αντισώματα, γιατί δεν αναγνωρίζουν ούτε αντιδρούν με το αντιγόνο που προκάλεσε τη σύνθεσή τους. Αντιθέτως αντιδρούν με υψηλής συγγένειας ειδικούς υποδοχείς, οι οποίοι βρίσκονται σε μικρό αριθμό στην επιφάνεια των κυττάρων και εκφράζονται κατόπιν κυτταρικής ενεργοποίησης. Δρουν

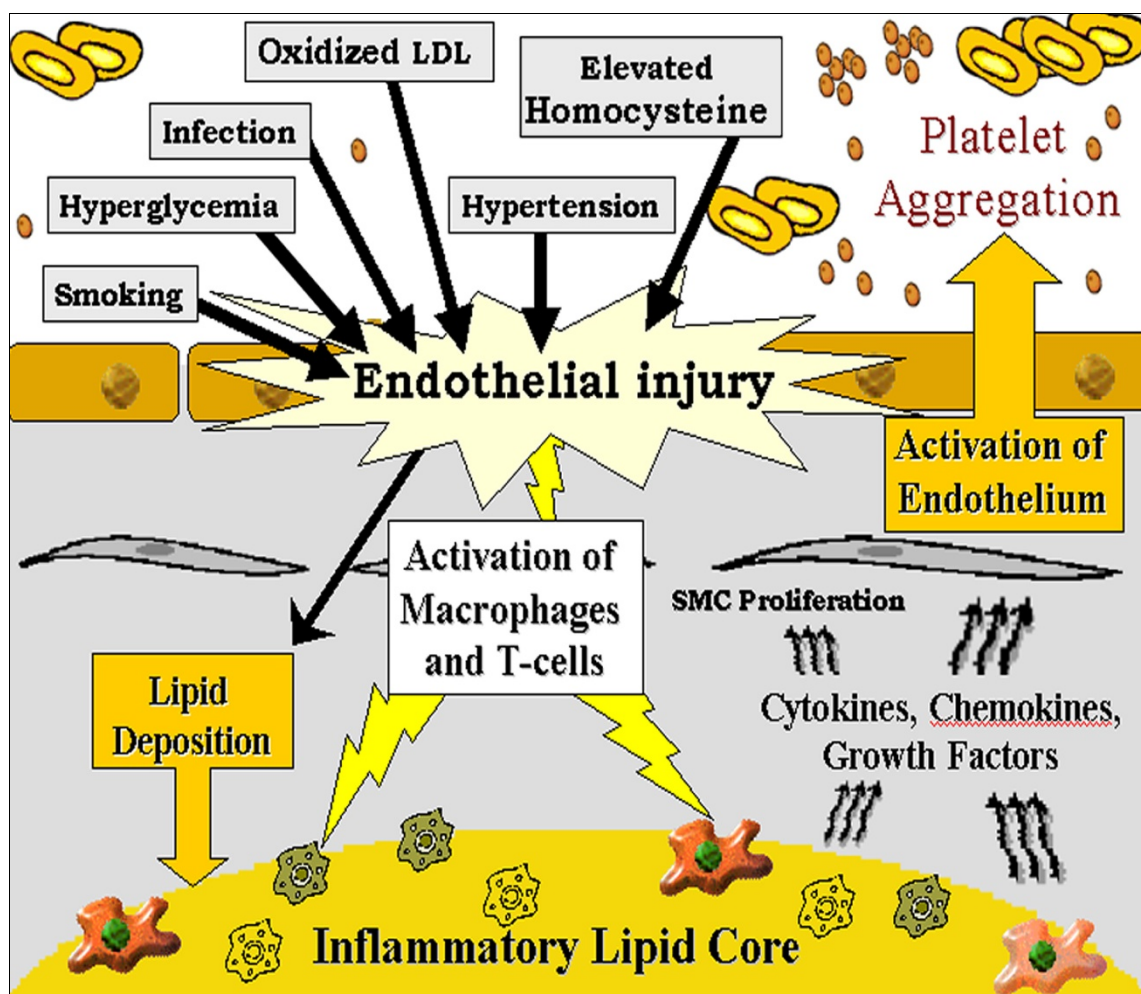
λοιπόν ως (α) μεσολαβητές της φυσικής ανοσίας, (β) ρυθμιστές της ειδικής ανοσολογικής απάντησης, (γ) ρυθμιστές της ενεργοποίησης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων, (δ) ρυθμιστές της φλεγμονής και (ε) διεγέρτες του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των αώρων λευκοκυττάρων. Γενικά ο κεντρικός ρόλος των κυτταροκινών είναι η ενορχήστρωση της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού και η εξασφάλιση της ισορροπίας μεταξύ των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος. Οι κυτταροκίνες που παράγονται από ενεργοποιημένα κύτταρα του συστήματος μονοπύρηνων-μακροφάγων καλούνται συχνά μονοκίνες, ενώ χημειοκίνες καλούνται μικρές κυτταροκίνες που συντίθενται όχι μόνο από τα μονοκύτταρα αλλά και από ενδοθηλιακά κύτταρα, κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες. Στην κατηγορία των κυτταροκινών ανήκουν: (α) οι ιντερλευκίνες (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6), (β) οι ιντερφερόνες (IFNs) τύπου I και II, (γ) ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-Tumor Necrosis Factor), (δ) ο παράγοντας διέγερσης των αποικιών (CSF-Colonies Stimulating Factor M-CSF, G-CSF, GM-CSF), (ε) ο παράγοντας β τροποποίησης της ανάπτυξης (TGF- β Transforming Growth Factor-β) και (στ) ο παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης (MIF-Migration inhibitory Factor).

Η δράση των κυτταροκινών διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης, υπογραμμίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη σημασία της φλεγμονώδους διεργασίας (Wick και συνεργάτες 1999).

Είναι γενικότερα αποδεκτό ότι ο τραυματισμός του ενδοθηλίου συμμετέχει στη γένεση της αθηροσκλήρωσης (Ross και συνεργάτες 1993). Η βλάβη αυτή του ενδοθηλίου μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση των διαφόρων παραγόντων κινδύνου που οδηγούν στη δυσλειτουργία του, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του για διάφορες ουσίες, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και η

χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL). Οι ουσίες αυτές διεισδύουν ευκολότερα στον υπενδοθηλιακό χώρο όπου οξειδώνονται από τα αγγειακά κύτταρα (Díaz και συνεργάτες 1997). Η οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη και οι κυτταροκίνες που εκλύονται τοπικά, επάγουν τη σύνθεση υπεροξειδίου (Díaz και συνεργάτες 1997). Παράλληλα αυξάνεται η έκφραση και σύνθεση μορίων συγκολλησεως των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια του ενδοθηλίου. Αυτό παρατηρείται ιδίως σε θέσεις του αγγειακού δένδρου που επικρατούν συνθήκες στροβιλώδους ροής, όπως είναι οι αρτηριακές διακλαδώσεις και ελικώσεις (Ross και συνεργάτες 1993). Η μερικώς οξειδωμένη LDL και οι χημειοτακτικοί παράγοντες που εκλύονται από τα αγγειακά κύτταρα (διεγερτικοί παράγοντες των αποικιών μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων, PDGF και IL-8) είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που οδηγούν στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον υπενδοθηλιακό χώρο και τη μετατροπή των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων σε μακροφάγα εντός του αγγειακού τοιχώματος. Τα μακροφάγα προκαλούν πλήρη οξείδωση των LDL λιποπρωτεϊνών, οι οποίες εισερχόμενες στο εσωτερικό τους τα μετατρέπουν σε αφρώδη κύτταρα, τα οποία μαζί με ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα σχηματίζουν τις λιπώδεις ραβδώσεις (Ross και συνεργάτες 1993, Díaz και συνεργάτες 1997). Οι λιπώδεις ραβδώσεις και τα μόρια συγκολλησεως του ενδοθηλίου προκαλούν ακολούθως συσσώρευση αιμοπεταλίων, τα οποία εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, που σε συνδυασμό με τις κυτταροκίνες προκαλούν μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων υποενδοθηλιακά και μετατροπή τους σε εκκριτικά κύτταρα. Αυτά τέλος εκκρίνουν εξωκυττάρια ουσία, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ινώδους κάψας και με τον τρόπο αυτό στην οργάνωση της αθηρωματικής πλάκας (Wick και συνεργάτες 1999, Ross και συνεργάτες 1993).

(εικόνα 9)



ΕΙΚΟΝΑ 9: Σχηματική παράσταση της έναρξης του καταρράκτη της αθηροσκλήρωσης με τον τραυματισμό του ενδοθηλίου.

10. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΑΕΕ

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία και συνεχίζουν να προστίθενται νέα σχετικά με τους σημαντικούς ρόλους της φλεγμονής και των γενετικών παραγόντων για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και συγκεκριμένα του ΑΕΕ. Η αθηροσκλήρωση δεν είναι μόνο νόσος της αυξημένης χοληστερόλης όπως είχε θεωρηθεί παλαιότερα αλλά μια δυναμική, χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση απότοκος του τραυματισμού του ενδοθηλίου (Elkind MS και συνεργάτες 2001). Παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου όπως η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτείνη (LDL) και το κάπνισμα συνεισφέρουν στον τραυματισμό του ενδοθηλίου καθώς και όπως παραπάνω έχει αναφερθεί ότι και οι λοιμώξεις βοηθούν στον τραυματισμό του ενδοθηλίου και στην αθηροσκλήρωση. Η γενετική προδιάθεση για ανάπτυξη ΑΕΕ είναι μάλλον πολυγονιδιακή αν και υπάρχουν συγκεκριμένες μονογονιδιακές διαταραχές που προκαλούν ΑΕΕ αναδεικνύοντας την δυναμικότητα της γενετικής στην ανάπτυξη ΑΕΕ. (Elkind MS και συνεργάτες 2002)

10.1 Παράγοντες κινδύνου και μηχανισμοί τραυματισμού

Λοιμώξεις

Οξείες ή πρόσφατες λοιμώξεις έχουν μελετηθεί καλά ως αίτια ΑΕΕ. Αρκετές μελέτες προσφέρουν στοιχεία ότι στατιστικά σημαντικός αριθμός ασθενών με ΑΕΕ (κυρίως μεγάλων αγγείων ή καρδιοεμβολικό) είχαν - σε σύγκριση με ομάδα μαρτύρων - δύο εβδομάδες πριν το ΑΕΕ (Sen S. και συνεργάτες 2007, λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού, ακόμη και σε ασθενείς με ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό αγγειακών παραγόντων κινδύνου (Grau AJ και συνεργάτες 2004,2005, Elkind MS και συνεργάτες 2005).

Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός όπου οι λοιμώξεις προκαλούν ΑΕΕ είναι ότι αυξάνεται η αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων καθώς και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων – λευκοκυττάρων με ως αποτέλεσμα αυξάνεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ως κίνδυνο ανάπτυξη ΑΕΕ (Nagel MA και συνεργάτες 2008). Επίσης ο αυξημένος αριθμός των λευκοκυττάρων είναι ανεξάρτητος παράγοντας αύξησης του πάχους της αθηρωματικής πλάκας στις καρωτίδες (Nagel MA και συνεργάτες 2008) και στο αορτικό τόξο (Davis MM και συνεργάτες 2006).

10.2 Φλεγμονώδεις δείκτες ως προγνωστικοί παράγοντες της προδιάθεσης για ΑΕΕ

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν αρκετοί φλεγμονώδεις παράγοντες που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση και το ΑΕΕ. Ακόμη και εντός των φυσιολογικών ορίων αυξήσεις των επιπέδων των εν λόγω παραγόντων μπορεί να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΑΕΕ. Τέτοιοι φλεγμονώδεις παράγοντες είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (hsCRP), το Α αμυλοειδές στον ορό (SAA), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και το CD40 ligand (CD40L). (Elkind MS και συνεργάτες 2002, Kalayoglu MV και συνεργάτες 2002).

10.3 Νόσος των καρωτίδων και φλεγμονώδεις δείκτες

Τελευταία υπάρχουν ολοένα και αυξανόμενοι υποστηρικτές της άποψης ότι οι φλεγμονώδεις δείκτες μπορούν να διακρίνουν τη συμπτωματική από την ασυμπτωματική στένωση των καρωτίδων και ότι αυτοί οι δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διακρίνουν σε ποιους ασθενείς η καρωτιδική στένωση θα προκαλέσει ή όχι συμπτώματα.

Εξετάσθηκαν οι πλάκες από συμπτωματικούς ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ενδαρτηρεκτομή και βρέθηκε στην ανοσοιστοχημική ανάλυση ότι είχαν σημαντικό αριθμό από φλεγμονώδη κύτταρα από ότι οι πλάκες από ασυμπτωματικούς ασθενείς (Elkind MS και συνεργάτες 2006).

10.4 Λοίμωξη και γονιδιακή αλληλεπίδραση

Η γενετική διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προδιάθεση για λοιμώξεις. Η άμυνα του ξενιστή μεταβάλλεται από την γενετική με τις υποομάδες του ανθρώπινου αντιγόνου των λευκοκυττάρων (HLA) το οποίο σχετίζεται με τις αυτοάνοσες απαντήσεις. Ένας λοιμώδης παράγοντας μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη απάντηση ενώ άλλες φορές όχι. Το ανωτέρω θα μπορούσε να εξηγήσει την διαφορετικότητα των μελετών στην βιβλιογραφία σχετικά με τις λοιμώξεις και την αθηροσκλήρωση. Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο MBL το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη υπεύθυνη για την επίσπευση της φαγοκυττάρωσης φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο λοιμώξεων στους ανθρώπους. Οι παραπάνω πολυμορφισμοί έχει βρεθεί ότι όχι μόνο σχετίζονται με την εμφάνιση αλλά και με το μέγεθος των αθηροσκληρωτικών πλακών. Επίσης μεταλλάξεις στο γονίδιο IL-1ra τροποποιούν τον κίνδυνο για ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου σχετιζόμενη με λοίμωξη από τον πνευμονιόκοκκο.

Ο TLR4-4 ανευρίσκεται στα μακροφάγα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Συνδέεται στον λιποσακχαρίτη των βακτηριδίων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση. Επίσης συνδέεται και με την ανασυνδιασμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους (LDL), το ινωδογόνο και με το NF-Kb. Η σύνδεση με τους παραπάνω υποδοχείς αποτελεί την έναρξη ενός καταρράκτη φλεγμονώδους απάντησης με ως αποτέλεσμα την

απελευθέρωση κυτοκινών, χυμοκινών και μόρια σύνδεσης. Στον υποδοχέα TLR4 ο πολυμορφισμός Asp299Gly συσχετίζεται με μείωση των μεσολαβητών της φλεγμονής μη λειτουργικοί TLR έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν ότι τα σχετιζόμενα γονίδια με την φλεγμονή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρωμάτωση. Χρειάζονται όμως και άλλες συγκριτικές μελέτες και σε άλλους πληθυσμούς. Ο προ-φλεγμονώδης γονότυπος, που έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη απάντηση κυτοκινών, μπορεί να αποτελούσε πλεονέκτημα της εξέλιξης. Στο παρελθόν, πιθανόν να βοηθούσε στην θεραπεία των πληγών και μείωση της επέκτασης της λοίμωξης σε περιόδους υποσιτισμού. Σήμερα, όπου το προσδόκιμο επιβίωσης έχει αυξηθεί, όλα αυτά που πριν είχαν ευεργετικούς ρόλους πιθανόν τώρα βοηθούν στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης καθώς και στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Στο μέλλον, θεραπείες που στοχεύουν την μείωση ή την αναστολή της φλεγμονής θα μπορούσαν να μειώσουν την αθηροσκλήρωση ή τις επιπλοκές της, συμπεριλαμβανομένου και του ΑΕΕ. (Hegele RA και συνεργάτες 2000, Boekholdt SM, και συνεργάτες 2003, Caso JR, και συνεργάτες 2008, Llewelyn M, και συνεργάτες 2004).

11. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΕΕ

Ενώ η συμβολή της γενετικής σε παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου όπως η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης και την υπερχοληστεριναιμία έχουν εκτεταμένα διερευνηθεί, ο ρόλος της γενετικής στην αιτιοπαθογένεια του ΑΕΕ παραμένει αμφίβολος. Η γενετική των μη παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου συμπεριλαμβανομένου και της φλεγμονής αποκτά ολοένα και περισσότερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Η έκθεση σε τοξίνες όπως το κάπνισμα και οι λοιμώξεις μπορεί επίσης να μεταβληθεί από γενετικούς παράγοντες. (Dichgans Martin Lancet Review 2007)

11.1 Εισαγωγή

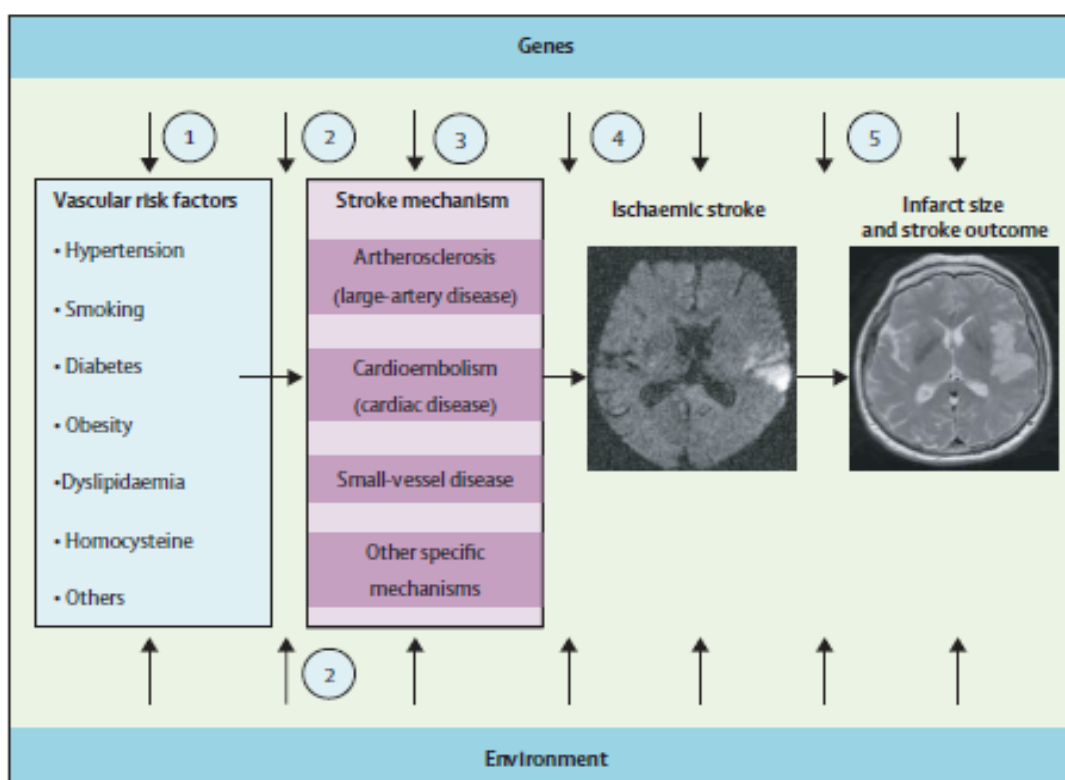
Το ΑΕΕ είναι η τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου και η πιο κοινή αιτία αναπηρίας στις ανεπτυγμένες χώρες. Περίπου το 80% των εγκεφαλικών επεισοδίων είναι ισχαιμικού τύπου. Η αθηροσκλήρωση των μεγάλων αρτηριών και των μικρών αγγείων (κεντοτοπιάδη έμφρακτα) καθώς και οι καρδιοεμβολές, είναι μακράν η πιο συχνή αιτία. Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου (ηλικία, Αφρικανική και Ασιατική φυλή, άνδρες), επίκτητοι παράγοντες κινδύνου (υπέρταση, κάπνισμα, σακχαρώδης διαβήτης, κολπική μαρμαρυγή, και η παχυσαρκία). (εικόνα 10)

11.2 Γενετικοί παράγοντες και ενδιάμεσοι φαινότυποι

Μελέτες σε διδύμους, οικογένειες, και ζωικά μοντέλα παρέχουν απόδειξη της συμβολής της γενετικής στο ΑΕΕ. (Flossmann E, et al *Stroke* 2004, Jeff s B, et al. *NatGenet* 1997). Ωστόσο, ο βαθμός της γενετικής προδιάθεσης είναι αβέβαιος. Σε διδύμους, έχουν αναφερθεί περίπου 65% ποσοστά αντιστοιχίας, περισσότερο σε

μονοζυγωτικούς από ό,τι σε διζυγωτικούς δίδυμους. Παραταύτα χρειάζονται περισσότερες μελέτες διότι ο μέχρι τώρα αριθμός τους είναι μικρός. Η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού ΑΕΕ έδειξε να αυξάνει τον κίνδυνο περίπου κατά 75%, (Flossmann E, et al *Stroke* 2004).

ΕΙΚΟΝΑ 10



Γενετικοί παράγοντες και ισχαιμικό επεισόδιο

Οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να αυξήσουν την επικινδυνότητα ανάπτυξης ισχαιμικού επεισοδίου σε διάφορα επίπεδα. Μέσο των γνωστών παραγόντων κινδύνου (1), σε αλληλεπίδραση των ανωτέρω με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου (2), ή μέσω συγκεκριμένου μηχανισμού ανάπτυξης ισχαιμικού επεισοδίου όπως αθηροσκλήρωση ή την νόσο των μικρών αγγείων (3).

Κατά τον ίδιο τρόπο, οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να αυξήσουν την επικινδυνότητα ανάπτυξης ισχαιμικού επεισοδίου σε διάφορα επίπεδα. Η αλληλεπίδραση των γονιδίων και του περιβάλλοντος μπορεί να γίνει σε διάφορα επίπεδα.

Σε μελέτες περιστατικών η γενετική προδιάθεση διαφέρει ανάλογα με την ηλικία και τον τύπο του ΑΕΕ. Οι ανωτέρω μελέτες δείχνουν μια ισχυρότερη γενετική προδιάθεση για ΑΕΕ σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 70 ετών σε σχέση με εκείνους που είναι άνω των 70 ετών.(Flossmann E, et al *Stroke* 2004, Schulz UG et al *Stroke* 2004, Jerrard-Dunne P et al *Stroke* 2003). Επίσης, φαίνεται ότι γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν περισσότερο σε ΑΕΕ μεγάλων και μικρών αγγείων από ό,τι σε κρυπτογενές ΑΕΕ, δεν υπάρχουν επιδημιολογικά στοιχεία για μια γενετική συνιστώσα στα καρδιοεμβολικά ΑΕΕ. Μια κοινή επιδημιολογική παρατήρηση είναι ότι το οικογενειακό ιστορικό εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι κοινό με ΑΕΕ μεγάλων αγγείων από ό,τι σε άλλους τύπους ΑΕΕ. Το τελευταίο τονίζει τη σημασία των διαφορετικών τύπων ΑΕΕ και υποστηρίζει την άποψη ότι το ΑΕΕ μεγάλων αγγείων καθώς και το έμφραγμα του μυοκαρδίου μοιράζονται παρόμοιους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς καθώς και γενετική προδιάθεση. Περαιτέρω πληροφορίες έχουν προέλθει από μελέτες σχετικά με τους ενδιάμεσους φαινότυπους. Υπάρχουν ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία, για την ύπαρξη γενετικής συνιστώσας στην αθηροσκλήρωση. Ο λόγος του πάχους του ενδοθηλίου της καρωτίδας και του πάχους του έσω τοιχώματος (IMT)Α είναι υποκατάστατο μέτρο ύπαρξης υποκλινικής αθηροσκλήρωσης. Εύρος τιμών του IMT από 30% έως 60% σημαίνει ότι ένα μεγάλο μέρος της μεταβλητότητας οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες. Είναι σημαντικό ότι αυτή η γενετική επίδραση φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου (οι περισσότερες εκτιμήσεις ελήφθησαν με προσαρμογή των δημογραφικών και των παραγόντων αγγειακού κινδύνου). Κατά μέσο όρο, οι μελέτες που περιελάμβαναν σε μεγάλο βαθμό συμμετέχοντες με καρδιαγγειακά νοσήματα ανέφεραν υψηλότερα ποσοστά κληρονομικότητας από ότι

οι μελέτες που περιελάμβαναν δείγματα πληθυσμού, το τελευταίο τονίζει τη σημασία των γενετικών παραγόντων στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις γενετικής συμβολής στην ισχαιμική λεύκο-αγγειοπάθεια (υποκατάστατο μέτρο για την εκτίμηση βλάβης των μικρών αγγείων-κενοτοποιώδη έμφρακτα). Εκτιμήσεις κληρονομικότητας για την εγκεφαλική λεύκο-αγγειοπάθεια ήταν της τάξεως του 55-70%. Λόγω της ισχυρής γενετικής συμβολής, οι ερευνητές έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούν το IMT και την λεύκο-αγγειοπάθεια σαν στόχους μελλοντικών γενετικών μελετών.

Γενετικοί παράγοντες μπορεί να δρουν σε διάφορα επίπεδα (εικονα 10). Συμβάλλουν μαζί με γνωστούς παράγοντες κινδύνου που έχουν γενετική συνιστώσα, όπως η υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης και τα επίπεδα ομοκυστεΐνης. Μπορεί να αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες ή να συμβάλλουν άμεσα στον ενδιάμεσο φαινότυπο, όπως η αθηροσκλήρωση. Για παράδειγμα, παραλλαγές στην αλληλουχία γονιδίων κυτταροκινών (inflammatory cytokine genes) φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το κάπνισμα με ως αποτέλεσμα ανάπτυξη ανάλογου κινδύνου αθηροσκλήρωσης. Τέλος, γενετικοί παράγοντες μπορεί να καθυστερήσουν την εμφάνιση ΑΕΕ, το μέγεθος του ισχαιμικού εμφράκτου ή την αποκατάσταση μετά από ΑΕΕ.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που διερευνούν την συμβολή γενετικών παραγόντων για την ανάπτυξη πολυπαραγοντικού ΑΕΕ. Ωστόσο, υπάρχουν πιο ισχυρά ευρήματα σε μονογονιδιακές διαταραχές. Παρακάτω ακολουθεί περιγραφή μονογονιδιακών και πολυγονιδιακών διαταραχών για την ανάπτυξη ΑΕΕ.

11.3 Μονογονιδιακές διαταραχές

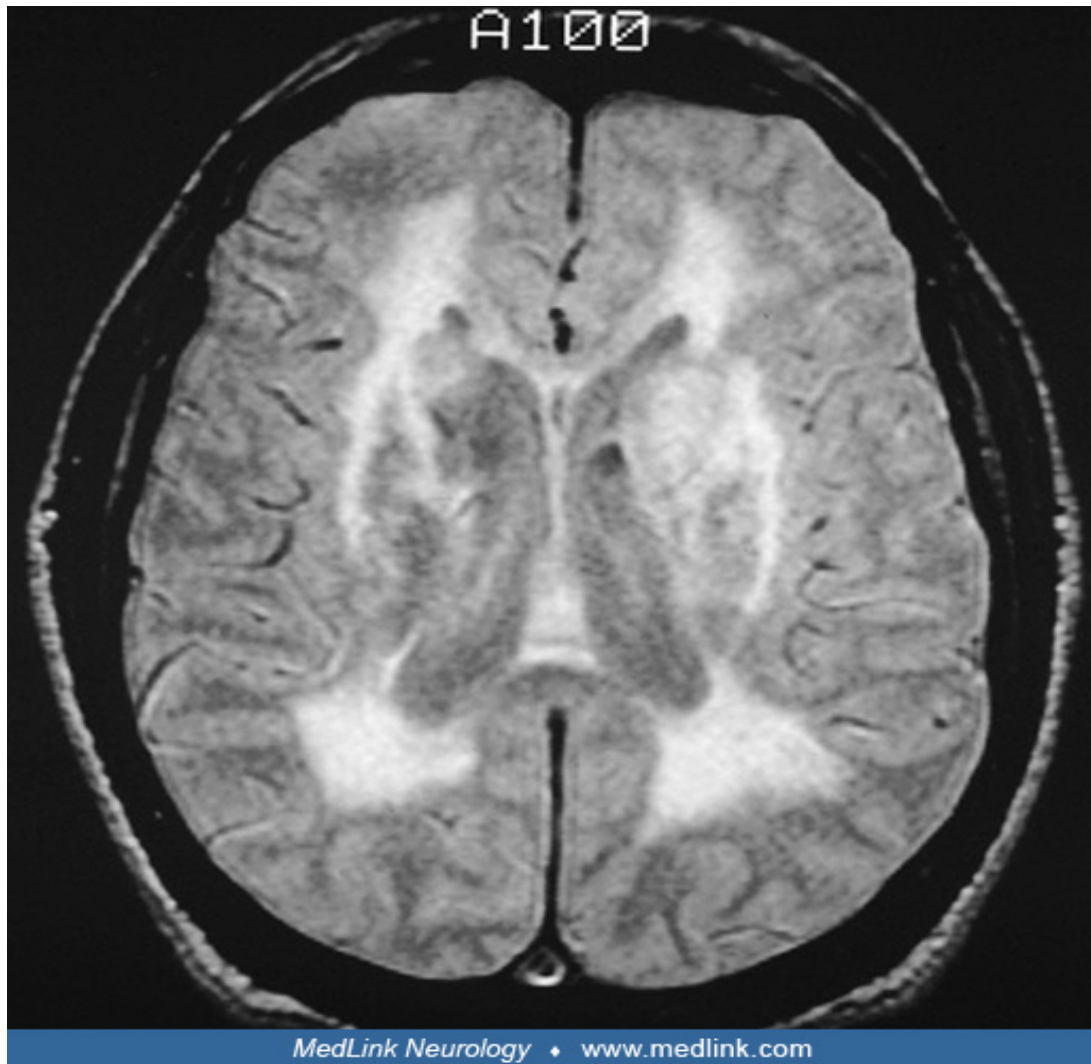
Μενδελιανές καταστάσεις είναι μια σημαντική αιτία ΑΕΕ ιδιαίτερα σε νέους ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο χωρίς γνωστούς παράγοντες κινδύνου. Σε ορισμένες μονογονιδιακές διαταραχές το ΑΕΕ είναι η επικρατούσα εκδήλωση, ενώ σε άλλες είναι μέρος ενός ευρύτερου φαινοτυπικού φάσματος. Οι περισσότερες μονογονιδιακές διαταραχές προκαλούν συγκεκριμένου τύπου ΑΕΕ. Ακολουθούν λεπτομερέστερα γνωστές μονογονιδιακές διαταραχές.

CADASIL

Εγκεφαλική αυτοσωματική επικρατητική αρτηριοπάθεια με υποφλοιώδη έμφρακτα και λευκοεγκεφαλοπάθεια (CADASIL). Είναι κληρονομική ασθένεια των μικρών αγγείων που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *NOTCH3*. Ο φαινότυπος εκφράζεται από επαναλαμβανόμενα εγκεφαλικά επεισόδια ή και παροδικά ισχαιμικά επεισόδια, προοδευτική έκπτωση των νοητικών λειτουργιών και ψυχιατρικές διαταραχές με έναρξη συνήθως την τρίτη δεκαετία της ζωής. Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών αναπτύσσουν ημικρανίες με αύρα.. Τα νευροαπεικονιστικά ευρήματα είναι όπως για τις βλάβες των μικρών αγγείων. Χαρακτηριστικό διαγνωστικό στοιχείο της CADASIL είναι η συμμετοχή της λευκής ουσίας του πρόσθιου κροταφικού λοβού και της έξω κάψας. Μεγάλων αγγείων ΑΕΕ έχουν αναφερθεί σποραδικά, αλλά μάλλον η εμφάνισή τους είναι τυχαία. (εικόνα 11)

Το γονίδιο *NOTCH3* κωδικοποιεί έναν επιφανειακό κυτταρικό υποδοχέα, ο οποίος έχει ρόλο στην ανάπτυξη των αρτηριών και εκφράζεται στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων. Ο Notch3 υποδοχέας είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από ένα μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα και ένα μικρότερο διαμεμβρανικό

ενδοκυττάριο τμήμα. Το φάσμα των μεταλλάξεων είναι ευρύ. Περίπου το 95% των ασθενών παρουσιάζουν ελλείμματα των εξονίων 3 και 6. Προκαταρκτικά στοιχεία δείχνουν ότι ορισμένες μεταλλάξεις σχετίζονται με ελαφρώς πιο επιθετικό φαινότυπο. Σε γενικές γραμμές, ωστόσο, ο γονότυπος φαίνεται να μην έχει σημαντικές επιδράσεις στον φαινότυπο. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μεταλλάξεις του γονιδίου *NOTCH3* γίνονται παθογόνες δεν είναι επαρκώς κατανοητοί. Ωστόσο, μελέτες σε ασθενείς και πειραματόζωα έχουν δείξει ότι ο μεταλλαγμένος υποδοχέας Notch3 συσσωρεύεται σε αρτηρίες και αρτηρίδια. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν εναποθέσεις από κοκκώδη οσμούφουλα εντός της βασικής αρτηριακής μεμβράνης, τα οποία είναι χαρακτηριστικά για CADASIL, είναι παρόντα σε όλο το αρτηριακό σύστημα, και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι η κλινική εικόνα και τα ευρήματα της μαγνητικής τομογραφίας μπορούν να ποικίλουν από ήπια έως πολύ σοβαρά. Τα στοιχεία δείχνουν ότι οι διακυμάνσεις της βαρύτητας της νόσου οφείλονται σε μια τροποποιητική δράση γενετικών παραγόντων διαφορετικών από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *NOTCH3*. (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).



ΕΙΚΟΝΑ 11: Μαγνητική τομογραφία (τομές FLAIR) ασθενούς με CADASIL, είναι σαφείς οι βλάβες της λευκής ουσίας (αυξημένης έντασης σήμα περικολιακά)

Νόσος του Fabry

Η νόσος Fabry είναι μια X φυλοσύνδετη διαταραχή που προκαλείται από ανεπάρκεια του λυσοσωμικού ενζύμου α-γαλακτοσιδάση Α. Ανεπάρκεια του ενζύμου οδηγεί σε προοδευτική συσσώρευση γλυκοσφιγγολιπιδίων, ιδιαίτερα σφαιροτριοζυλοκεραμίδιο στο μυοκάρδιο στον νεφρικό επιθήλιο, το δέρμα, τα μάτια, και το αγγειακό σύστημα. Η έναρξη είναι συνήθως στην παιδική ηλικία ή την εφηβεία με παραισθησίες άκρων, αγγειοκεράτωμα, ή υποιδρωσία. Συστηματικές επιπλοκές συμβαίνουν στην ενηλικίωση (συνήθως μέση ηλικία) αφορούν τους νεφρούς, την καρδιά, και τον εγκέφαλο. Η Νόσος του Fabry είναι συχνή σε νέους με ΑΕΕ. Σε μια μεγάλη σειρά από νέους (18 έως 55 ετών) με κρυπτογενές εγκεφαλικό επεισόδιο το 4,9% των ανδρών και το 2,4% των γυναικών έδειξαν ότι έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο της α-γαλακτοσιδάσης (*GLA*). Τα ΑΕΕ που μπορεί να συμβούν έχουν κατανομή μικρών ή και μεγάλων αγγείων κυρίως της οπίσθιας κυκλοφορίας. Στοιχεία δείχνουν ότι οι βλάβες των μικρών αγγείων πιθανόν οφείλονται σε πολυμορφισμούς στα γονίδια της ιντερλευκίνης 6, της ενδοθηλιακής συνθετάσης, του νιτρικού οξειδίου, του παράγοντα V, και της πρωτεΐνης Z. Το ανωτέρω εύρημα είναι πολλά υποσχόμενο αλλά αναμένονται περισσότερες μελέτες προς επιβεβαίωση.

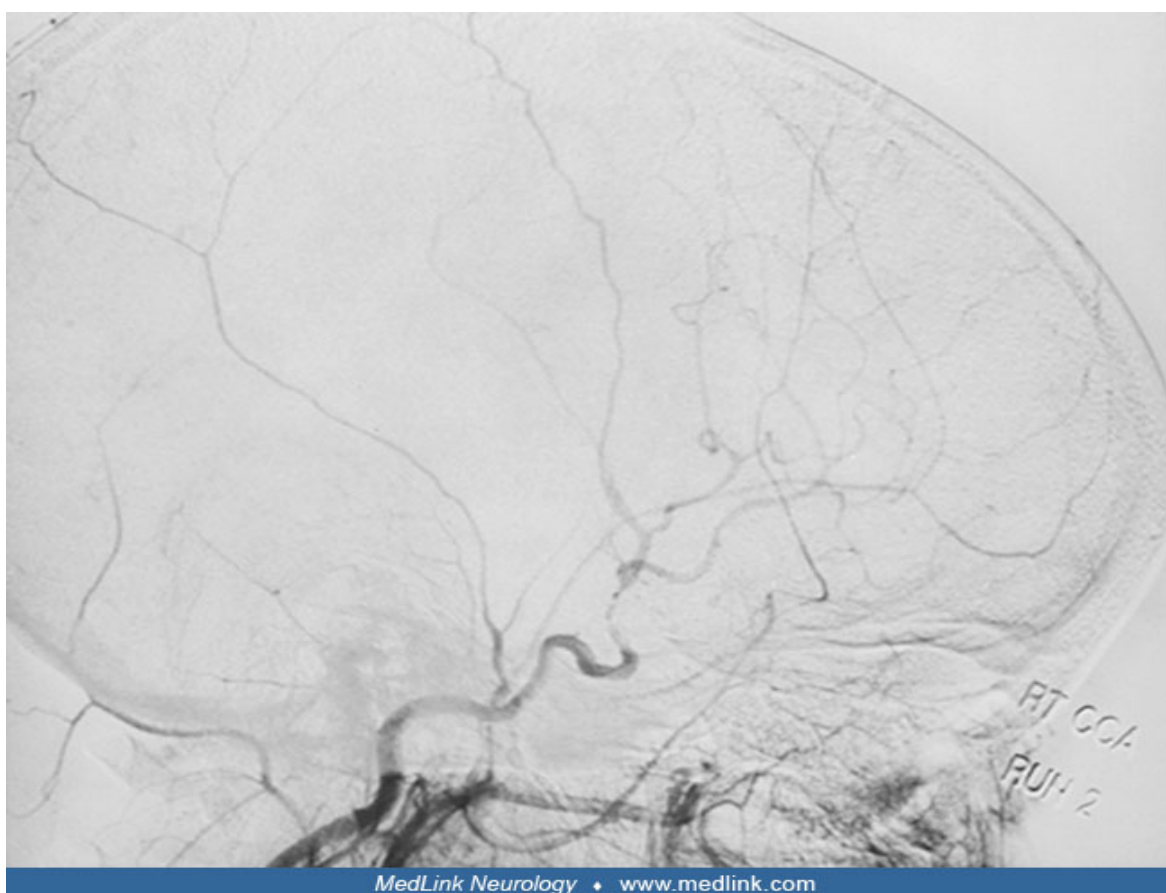
Η νόσος του Fabry μπορεί να υποπτευθεί, με βάση την κλινική εικόνα, να επιβεβαιωθεί από την μέτρηση της δραστηριότητας της α-γαλακτοσιδάσης Α ή μέσω ελέγχου μεταλλάξεων. Η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου είναι λιγότερο αξιόπιστη στις γυναίκες που είναι φορείς της νόσου. Το φάσμα των μεταλλάξεων είναι ευρύ. Οι περισσότεροι ασθενείς φέρουν μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή του *GLA*. Η θεραπεία στην παρούσα φάση είναι η χορήγηση

υποκατάστασης με ανασυνδυασμένη μορφή α-γαλακτοσιδάσης, είναι αποτελεσματική στην μη συσσώρευση γλυκοσφιγγολιπιδίων καθώς και να βελτιώνει κάποια από τα συμπτώματα. (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).

Δρεπανοκυτταρική αναιμία

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι η πιο κοινή αιτία εγκεφαλικού επεισοδίου σε παιδιά. Η ασθένεια μπορεί να προκληθεί από την ομόζυγη κατάσταση για την αιμοσφαιρίνη S (HbS) ή από την συνδυασμένη ετερόζυγη κατάσταση με άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες όπως αιμοσφαιρίνη C (HbC) ή α-θαλασσαιμία. Η HbS είναι αποτέλεσμα αντικατάστασης ενός αμινοξέος στην β αλυσίδα του β-γονιδίου σφαιρίνης. Περίπου το 25% των ομόζυγων ασθενών HbS / HbS και το 10% των διπλών ετερόζυγων HbS / HbC θα υποστούν εγκεφαλικό επεισόδιο μέχρι την ηλικία των 45 ετών. Σε ασθενείς με HbS / HbS η συχνότητα του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου είναι υψηλότερη μεταξύ 2-5 ετών και χαμηλότερη μεταξύ 20-30 ετών. Αντίθετα, ο κίνδυνος αιμορραγικού εγκεφαλικού επεισοδίου είναι υψηλότερος στην τρίτη δεκαετία. Είναι συνηθες φαινόμενο η υποτροπή AEE, που συνήθως οφείλεται σε βλάβη των μεγάλων αρτηριών. Οι ανωτέρω βλάβες χαρακτηρίζονται από πάχυνση του έσω χιτώνα, στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και των λείων μυικών κυττάρων με ως τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό θρόμβου. Η ανωτέρω διαδικασία συνήθως παρατηρείται στο υπερκλινοειδές τμήμα της έσω καρωτίδος και τα εγγύς τμήματα της μεσης και της πρόσθιας εγκεφαλικής αρτηρίας. Τα ισχαιμικά έμφρακτα συνήθως βρίσκονται στις μεταιχμιακές περιοχές, ιδίως τις πρόσθιες και εν τω βάθει μεταιχμιακές περιοχές. Εκτός από τα AEE εκ των μεγάλων αρτηριών πολλοί ασθενείς αναπτύσσουν μικρά σιωπηλά έμφρακτα στις υποφλοιώδης περιοχές λόγω βλάβης των μικρών αγγείων. Ένα κρίσιμο συστατικό στην παθογένεια των δύο

τύπων ΑΕΕ (μεγάλων και μικρών αγγείων) είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ των δρεπανοκυττάρων και του ενδοθηλίου των αρτηριών. Τα δρεπανοκύτταρα έχουν την τάση να συναθροίζονται στο ενδοθήλιο, με ως αποτέλεσμα να ευνοείται ο σχηματισμός θρόμβου με ως αποτέλεσμα την απόφραξη των αγγείων. Η περαιτέρω ενεργοποίηση του ενδοθηλίου προωθεί αναδιαμόρφωση του αρτηριακού τοιχώματος και αγγειοπάθεια. (εικόνα 12) (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).



ΕΙΚΟΝΑ 12: Ψηφιακή αγγειογραφία εγκεφάλου όπου φαίνεται μεγάλου βαθμού στένωση της έσω καρωτίδος ΔΕ σε ασθενή με δρεπανοκυτταρική αναιμία

Ομοκυστινουρία

Περιλαμβάνει μια ομάδα που χαρακτηρίζεται από ελλείψεις ενζύμων (κυρίως αυτοσωματικής υπολειπόμενης αιτιολογίας), τα οποία προκαλούν υψηλές ($>100\mu\text{mol/L}$) συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης στο πλάσμα και ομοκυστινουρίας. Η νόσος θα πρέπει να εξετάζεται σε κάθε παιδί με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, νοητική υστέρηση, ατραυματική (ως επί το πλείστον προς τα κάτω) παρεκτόπιση των οφθαλμικών φακών, ή σκελετικές ανωμαλίες τύπου Marfan. Η Ομοκυστινουρία θα πρέπει να διακρίνεται από πιο ήπια ($15-100\mu\text{mol/L}$) υπερομοκυστειναιμία, η οποία είναι παράγοντας κινδύνου για εγκεφαλικό επεισόδιο στο γενικό πληθυσμό και συνδέεται με διαιτητικές ελλείψεις B6, B12, ή φυλλικού οξέος. Η πιο κοινή αιτία ομοκυστινουρίας είναι η έλλειψη κυσταθιονίνης βήτα συνθετάσης (CBS), ένα ένζυμο κλειδί για τον μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης. Σπανιότερα, η ομοκυστινουρία προκύπτει από διαταραχές της μετατροπής της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη από ένα μονοπάτι που απαιτεί το σχηματισμό των μεθυλιωμένων παραγώγων του φυλλικού οξέος και της B12. Περίπου το 50% των ασθενών με έλλειψη της κυσταθιονίνης βήτα συνθετάσης (CBS), χωρίς θεραπεία, παρουσιάζουν τουλάχιστον ένα θρομβοεμβολικό επεισόδιο μέχρι την ηλικία των 30 ετών (περίπου το 1/3 αυτών των επεισοδίων αφορούν το αγγειακό εγκεφαλικό δίκτυο). Η ομοκυστινουρία μπορεί να προκαλέσει εγκεφαλικό επεισόδιο, όχι μόνο μέσω της αθηροσκλήρωσης και θρομβοεμβολής, αλλά και μέσω βλάβης των μικρών αγγείων όπως επίσης προκαλώντας αρτηριακούς διαχωρισμούς.

Έχει αποδειχθεί ότι η ομοκυστεΐνη μπορεί να τραυματίσει τα ενδοθηλιακά κύτταρα και να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Περίπου το 50% των ασθενών με έλλειψη της κυσταθιονίνης βήτα συνθετάσης

ανταποκρίνονται στην χορήγηση B6. Σε όσους ανταποκρίνονται φαίνεται να καθυστερείται η εξέλιξη της νόσου, έχουν ηπιότερο φαινότυπο, και γενικότερα καλύτερη πρόγνωση από εκείνους που δεν ανταποκρίνονται. Το φάσμα των μεταλλάξεων της έλλειψης της κυσταθιονίνης βήτα συνθετάσης είναι ευρύ. Υπάρχουν πολλές “ιδιωτικές” μεταλλάξεις (δηλαδή, μοναδικές για μία οικογένεια), αλλά κάποιες μεταλλάξεις, ειδικότερα η Ile278Thr και Gly307Ser, είναι σχετικά συχνές. Μια σημαντική παρατήρηση σχετικά με τον γονότυπο-φαινότυπο είναι ότι ορισμένες μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένων των Ala114Val και Ile278Thr, είναι που σχετίζονται με την ανταπόκριση στην χορήγηση B6 ενώ άλλες, ειδικότερα η Gly307Ser, συνδέονται με αντίσταση στην χορήγηση της B6. Η πρόωμη διάγνωση της ομοκυστινουρίας είναι σημαντική διότι με την χορήγηση έγκαιρης θεραπείας μπορούν να προληφθούν οι επιπλοκές. (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).

MELAS

Το σύνδρομο της μιτοχονδριακής μυοπάθειας, εγκεφαλοπάθειας, γαλακτικής οξείδωσης, και επεισόδια σαν AEE (MELAS) χαρακτηρίζεται από πολλές μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA. Περίπου το 80% των ασθενών φέρουν αλλαγή A σε G στην θέση 3243 στο tRNA. Η δεύτερη πιο συχνή μετάλλαξη (T3271C) ανευρίσκεται στο 10% των περιπτώσεων. Η σχετική διανομή του μεταλλαγμένου και του άγριου τύπου (wild-type) μητρικού DNA διαφέρει από ιστό σε ιστό, ως εκ τούτου γενικά μπορεί να εξηγηθεί η διαφορετικότητα του φαινότυπου στις μιτοχονδρικές διαταραχές. Οι ασθενείς με MELAS παρουσιάζουν διάφορα συμπτώματα πχ: σακχαρώδη διαβήτη, ημικρανίες, επιληπτικές κρίσεις,

έκπτωση ανωτέρων λειτουργιών. Παραταύτα υφίστανται περιπτώσεις που παρουσιάζουν AEE ως το κύριο σύμπτωμα.

Οι εγκεφαλικές βλάβες στο σύνδρομο MELAS διαφέρουν των τυπικών ισχαιμικών εμφράκτων. Σε αρκετές περιπτώσεις οι βλάβες δεν έχουν αγγειακή κατανομή καθώς επίσης στην αγγειογραφία δεν ανευρίσκονται εμβολικού ή στενωτικού τύπου βλάβες. Όλα τα ανωτέρω καταδεικνύουν ότι για την εμφάνιση AEE υφίστανται και άλλοι μηχανισμοί πέραν της ισχαιμίας. Πρόσφατος παθοφυσιολογικός μηχανισμός περιλαμβάνει 1) διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού 2) διαταραχή αυτορύθμισης της εγκεφαλικής αιματικής ροής και 3) πρωτογενής ελλείματα του νευρωνικού μεταβολισμού οξείδωσης. (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).

11.4 Παθήσεις του συνδετικού ιστού

Το AEE είναι γνωστή επιπλοκή αρκετών συγγενών παθήσεων του συνδετικού ιστού. Το σύνδρομο Marfan είναι μια αυτοσωματική επικρατούσα συστηματική διαταραχή που προσβάλλει το μυοσκελετικό και καρδιοαγγειακό σύστημα καθώς και τους οφθαλμούς. Συνήθως διαγιγνώσκεται σε κλινική βάση και ως εκ τούτου ο ρόλος της γενετικής διάγνωσης είναι περιορισμένος. Το σύνδρομο Marfan προκαλείται από μεταλλάξεις ενός μεγάλου γονιδίου (*FBNI* 65 εξόνια) ενώ περίπου το 90% των οικογενειών έχουν διαφορετικές μεταλλάξεις, το ανωτέρω έχει ως αποτέλεσμα η διενέργεια γενετικού ελέγχου να είναι χρονοβόρα. Το *FBNI* γονίδιο κωδικοποιεί την φμπριλίνη 1 (εξωκυτάρια σύνθετη πρωτεΐνη), όπου παρατηρείται σε πολλούς ιστούς όπως η καρδιά και οι αρτηρίες. Οι επιπλοκές εκ των εγκεφαλικών αγγείων περιλαμβάνουν παροδικά AEE, ισχαιμικά έμφρακτα και υποσκληρίδια αιματώματα. Συνήθως οι νευροαγγειακές εκδηλώσεις σχετίζονται με

καρδιογενείς εμβολές όπως ύπαρξη προσθετικών βαλβίδων, πρόπτωση μιτροειδούς και κολπική μαρμαρυγή, συνήθως χωρίς ύπαρξη συσχέτισης με παθήσεις της αορτής ή με διαχωρισμό εγκεφαλικών αγγείων.

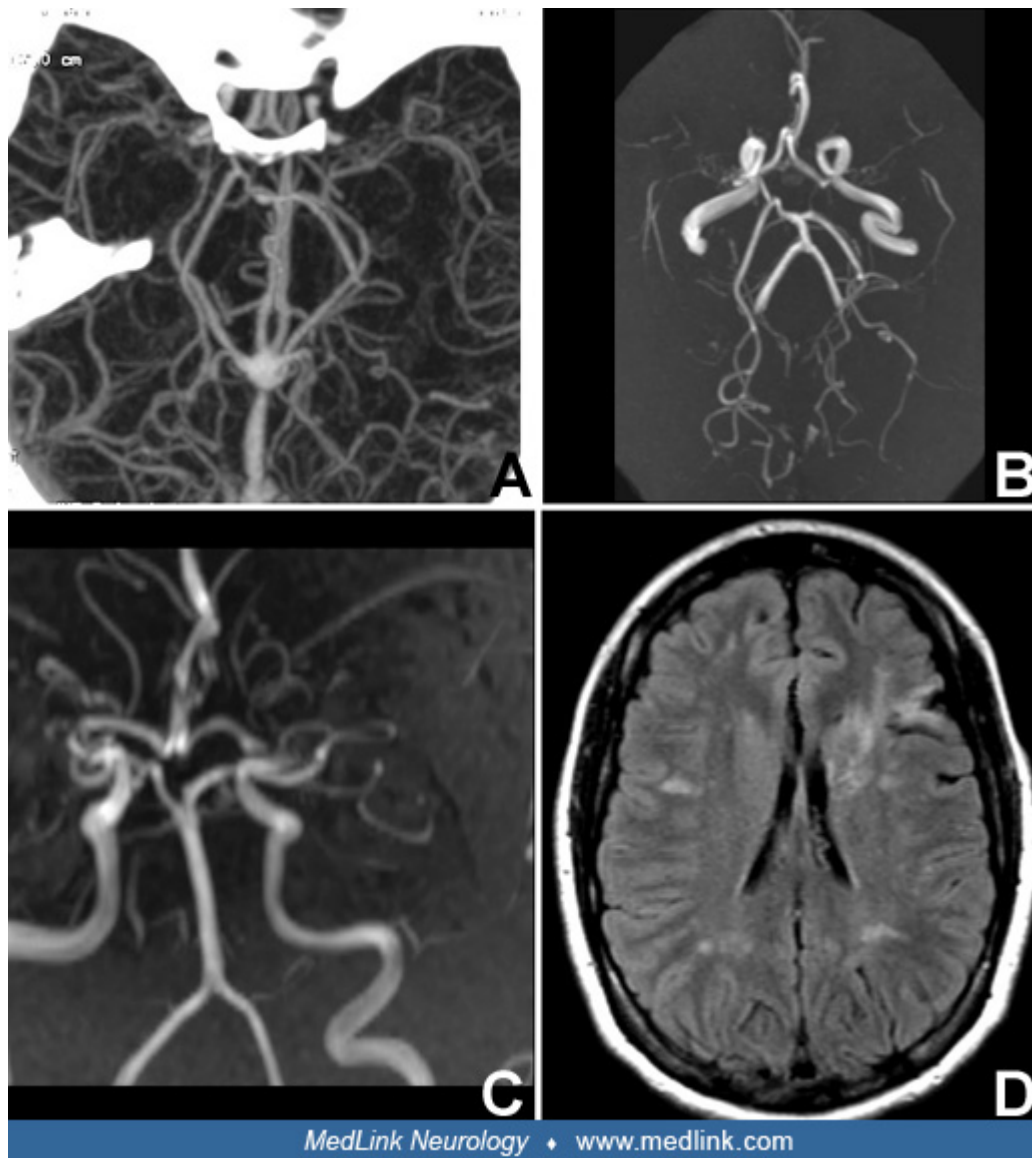
Το σύνδρομο Ehlers-Danlos τύπου IV, αγγειακού τύπου, είναι αυτοσωματική επικρατούσα διαταραχή που προκύπτει από μεταλλάξεις στο γονίδιο *COL3A1*. Η διαταραχή μπορεί να υποπτευθεί σε κλινικό επίπεδο (αρτηριακοί διαχωρισμοί, λεπτό δέρμα με ορατές φλέβες) και μπορεί να πιστοποιηθεί με έλεγχο των μεταλλάξεων ή διενέργεια βιοχημικών εξετάσεων στους ινοβλάστες (σύνθεση ανώμαλου τύπου III προκολλαγόνου). Το εύρος των μεταλλάξεων είναι ευρύ, ως εκ τούτου η εύρεση νέων μεταλλάξεων είναι συχνή. Περίπου στο 50% των περιπτώσεων δεν υφίστανται οικογενειακό ιστορικό. Οι εκ του εγκεφάλου αγγειακές επιπλοκές είναι συχνές και περιλαμβάνουν ενδοκράνια ανευρύσματα, αρτηριακούς διαχωρισμούς καθώς και αυτόματη ρήξη των μεγάλων και μέσου μεγέθους αρτηριών.

Άλλες περιπτώσεις εμφάνισης ΑΕΕ σε διαταραχές του συνδετικού ιστού είναι στο ελαστικό ψευδοξάνθωμα και στην ατελή οστεογενεση. Παθοφυσιολογικά παρατηρούνται αγγειακές στενώσεις περιφερικά των καρωτίδων καθώς και ύπαρξη βλάβης των μικρών αγγείων.

Νόσος Moyamoya

Είναι ένα χρόνια εξελικτικό νόσημα που χαρακτηρίζεται από αμφοτερόπλευρη απόφραξη του τελικού κλάδου των καρωτίδων σε συνδυασμό από τελεαγγειεκτάσιες στην βάση του κρανίου. Η νόσος είναι ιδιαίτερα σπάνια σε μη Ασιάτες ενώ η εμφάνιση της στην Ιαπωνία είναι $>3/100000$. Η πιο συχνή κλινική έκφραση είναι η εμφάνιση παροδικού ΑΕΕ στην παιδική ηλικία, ισχαιμικού ΑΕΕ

και επιληπτικών κρίσεων. Η ρήξη των τελεαγγειεκτατικών αγγείων προκαλεί ενδοκράνιο αιμορραγία όπου είναι η κύρια κλινική έκφραση σε ασθενείς >30 ετών. Περίπου το 10% των περιπτώσεων είναι ενδοοικογενειακές περιπτώσεις αλλά χωρίς να υπάρχουν περισσότερα στοιχεία σχετικά με τον τύπο της μεταβίβασης. Η νόσος έχει συνδεθεί με μοριακές διαταραχές στις γενομικές περιοχές των χρωμοσωμάτων 3p, 8q και 17q. (εικόνα 13)



ΕΙΚΟΝΑ 13: Νοσος Moyamoya. Στένωση του τελικού κλάδου των έσω καρωτίδων καθώς και σημαντική στένωση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας αμφοτερόπλευρα όπως φαίνεται στην αξονική αγγειογραφία (A) και στην μαγνητική αγγειογραφία (B&C). Στην μαγνητική τομογραφία (FLAIR τομές, D) φαίνονται ισχαιμικές αλλοιώσεις άμφω.

11.5 Πολυπαραγοντικό ΑΕΕ και γενετικοί παράγοντες ισχαιμικού ΑΕΕ

Η εμφάνιση κοινού πολυπαραγοντικού ΑΕΕ φαίνεται να έχει πολυγονιδιακή βάση. Πιθανότατα να υπάρχουν αλληλία μικρής επίδρασης (σχετικός κίνδυνος <1,5), όμως λόγω της ευρείας τους κατανομής στον γενικό πληθυσμό η εμφάνιση ΑΕΕ είναι μεγάλη. Έχει αναγνωρισθεί ότι η επίδραση κάποιων αλληλίων περιορίζεται σε 1-2 υπότυπους ΑΕΕ και η περαιτέρω κλινική έκφραση εξαρτάται από το φύλο και την φυλή (εικόνα 10)

Παλαιότερες μελέτες ερεύνησαν γενετικούς παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ σε μεμονωμένα κλινικά περιστατικά. Προς μεγαλύτερη αξιοπιστία, ιδιαίτερα για μικρότερους γενετικούς κινδύνους απαιτείται μεγάλο δείγμα ασθενών (>1000). Όμως, λίγες μελέτες έχουν επιτύχει τέτοιους αριθμούς. Το ανωτέρω, σε συνδυασμό με διαφορές στα χαρακτηριστικά των δειγμάτων καθώς και του σχεδιασμού της μελέτης, θα μπορούσε να εξηγήσει την διαφορετικότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ των μελετών.

Οικογενής προδιάθεση είναι πιο εύκολα αποδεικνυόμενη στην στεφανιαία νόσο παρά στο εγκεφαλικό επεισόδιο διότι στο ΑΕΕ είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει αρκετές ασθένειες (πχ νόσο μεγάλων αγγείων, μικρών αγγείων και καρδιοεμβολών). με διαφορετικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την ισχαιμία του εγκεφαλικού ιστού. Σε αντίθεση η στεφανιαία νόσος, είναι συχνά αθηροσκληρωτική νόσος των στεφανιαίων αγγείων.

Ως αποτέλεσμα, αναπόφευκτα οι επιδημιολογικές μελέτες περιορίζονται σε ετερογενείς φαινότυπους σε διαφορετικές ομάδες του ισχαιμικού ΑΕΕ, ακόμη ορισμένες φορές χωρίς να ξεχωρίζουν μεταξύ του ισχαιμικού και του αιμορραγικού τύπου ΑΕΕ. (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).

Ακολουθούν διαφορά παραδείγματα όπου έχουν επικεντρωθεί σε συγκεκριμένα γονίδια.

Μεταβολισμός Ομοκυστεΐνης

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις Ομοκυστεΐνης πλάσματος αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης ΑΕΕ. Ένας κοινός πολυμορφισμός (C677T) στο γονίδιο που κωδικοποιεί 5.10-methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) ένα σημαντικό ένζυμο στον καταβολισμό της Ομοκυστεΐνης, ευθύνεται για αυξημένες τιμές Ομοκυστεΐνης και κατ' επέκταση αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ. Ο γονότυπος T677T, ο οποίος ανευρίσκεται στο 10% του πληθυσμού, αυξάνει την ολική Ομοκυστεΐνη κατά 20%. Σε μια μελέτη συσχετισμού των συγκεντρώσεων Ομοκυστεΐνης και του *MTHFR* C677T αλληλίου φάνηκε ότι είναι σημαντικοί παράγοντες κινδύνου ΑΕΕ μικρών αγγείων που δεν περιορίζονται μόνο στα μεγάλα αγγεία. Εάν η θεραπεία μείωσης της Ομοκυστεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ΑΕΕ είναι προς παρόν αδιευκρίνιστο. (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).

Σύστημα Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης-Αλδοστερόλης (ΣΡΑΑ)

Υπάρχουν στοιχεία από μελέτες όπου υποστηρίζουν ότι γενετικές διαταραχές στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόλης (ΣΡΑΑ) συνεισφέρουν στην ανάπτυξη παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη ισχαιμικού ΑΕΕ. Επί παραδείγματι ο I/D (insertion/deletion) πολυμορφισμός στο μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (*ACE*). Το γονίδιο *ACE* παράγει αγγειοτενσίνη II και καταβολίζει την βραδυκίνη με αποτέλεσμα να επηρεάζει τον τόνο των αγγείων, την λειτουργία του ενδοθηλίου καθώς και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών ινών.

Το ΣΡΑΑ επηρεάζει την αρτηριακή πίεση. Η μέση συγκέντρωση ACE στους φορείς D/D είναι περίπου διπλάσια από την συγκέντρωση στους II φορείς. Ως εκ τούτου ο I/D πολυμορφισμός είναι ισχυρός υποψήφιος καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου.

Πηκτικότητα

Προθρομβωτικές καταστάσεις όπως η αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C και ο πολυμορφισμός στον παράγοντα V Leiden είναι αποδεδειγμένα παράγοντες κινδύνου για φλεβική θρόμβωση αλλά ο ρόλος τους στο ισχαιμικό ΑΕΕ είναι αμφιλεγόμενος.

Φωσφοδιεστεράση 4D

Το *PDE4D* βρίσκεται σε μια περιοχή στο χρωμόσωμα 5q12 κοντά στο γονίδιο *STRK1*.

Μια σημαντική παρατήρηση ήταν ότι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της φωσφοδιεστεράσης 4D (*PDE4D*) πιθανόν να σχετίζονται με ανάπτυξη ισχαιμικού ΑΕΕ σε ασθενείς από την Ισλανδία. Σε περαιτέρω μελέτες αρκετοί πολυμορφισμοί στο *PDE4D* είχαν συσχετισθεί με ανάπτυξη καρδιογενούς ΑΕΕ καθώς και ΑΕΕ εκ των καρωτίδων. Όμως μέχρι σήμερα παραμένει αδιευκρίνιστο εάν το ΑΕΕ προκαλείται διαμέσου αθηροσκλήρωσης ή είναι καρδιογενούς ή καρωτιδικής προέλευσης. Αρκετές μελέτες σε διάφορους πληθυσμούς και φυλές ανέδειξαν αποτελέσματα με διαφορετικότητα το πιθανότερο λόγω διαφορετικών υποτύπων ΑΕΕ, σχεδιασμού μελέτης καθώς επίσης ότι η επίδραση του *PDE4D* στο ΑΕΕ διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών εξαρτώμενη από το διαφορετικό γενετικό ιστορικό καθώς και από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος. (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).

ALOX5AP

Ένας συχνός απλότυπος (HarA) έχει συσχετισθεί με 1,8 αύξηση του κινδύνου για έμφραγμα του μυοκαρδίου και 1,7 αύξηση του κινδύνου για ΑΕΕ στον Ισλανδικό πληθυσμό. Το ανωτέρω ήταν στατιστικά σημαντικότερο στους άνδρες παρά στις γυναίκες καθώς επίσης παρατηρήθηκε εξίσου στο ισχαιμικό και στο αιμορραγικό ΑΕΕ. Η παραπάνω συσχέτιση του προαναφερθέντος απλότυπου παρατηρήθηκε και σε μια μελέτη σε πληθυσμό από την Σκωτία και την Γερμανία. Άλλες μελέτες σε πληθυσμούς άλλων χωρών δεν βρήκαν συσχέτιση.

Το γονίδιο *ALOX5AP* κωδικοποιεί την 5-λιποξυγενάση ενεργοποιό πρωτεΐνη (FLAP), σημαντικό συστατικό για την λειτουργία των λευκοτριενών οι οποίες είναι προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές και έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεση και ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.

Μόλις πρόσφατα βρέθηκε ένα ακόμη γονίδιο όπου συμμετέχει στην λειτουργία των λευκοτριενών και κατ' επέκταση στην αύξηση του κινδύνου για έμφραγμα του μυοκαρδίου, το γονίδιο της LTA4 υδρολάσης. (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).

Άλλα υποψήφια γονίδια-μηχανισμοί για την παθογένεση του ΑΕΕ

Γενετικές μελέτες πρόσφατα έχουν υποδείξει γονίδια υπεύθυνα για καρδιαγγειακά νοσήματα. Έχει αναφερθεί για το χρωμόσωμα 9q21 το οποίο έχει συσχετισθεί με το έμφραγμα του μυοκαρδίου και στεφανιαία νόσο. Συγκεκριμένος απλότυπος στο χρωμόσωμα 9q21, κοντά στα γονίδια *CDKN2A* και *CDKN2B* έχουν συσχετισθεί και με ισχαιμικό ΑΕΕ (Larson MG, και συνεργάτες 2007).

Είναι μακρά η λίστα των γονιδίων που έχουν μελετηθεί και η προσπάθεια να συσχετισθούν με ισχαιμικό ΑΕΕ.

Ανάμεσα στα περισσότερα μελετημένα γονίδια είναι αυτά που εμπλέκονται με

1) την φλεγμονή, (π.χ: ιντερλευκίνη 1, ιντερλευκίνη 6, TNFα, toll-like receptor 4, P-selectin και E-selectin, CRP),

2) τον μεταβολισμό των λιπιδίων (π.χ απολιποπρωτεΐνη E, paraoxonase, epoxide hydrolase),

3) απελευθέρωση νιτρικού οξιδίου, και το **4)** εξωκυττάριο matrix (πχ matrix μεταλλοπρωτεϊνών). Τα περισσότερα αποτελέσματα όλων των ανωτέρω μελετών ή ήταν αρνητικά ή εάν είχαν θετική συσχέτιση δεν μπόρεσαν να επιβεβαιωθούν σε άλλες μελέτες (Dichgans Martin και συνεργάτες 2007).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ALOX5AP ΚΑΙ ΑΕΕ

Το γονίδιο *ALOX5AP* κωδικοποιεί την 5 λιποξυγενάση ενεργοποιό πρωτεΐνη (FLAP) που είναι σημαντικός μεσολαβητής στην λειτουργία της κυτταρικής 5 – λιποξυγενάσης (5-LO) το οποίο είναι ένζυμο κλειδί για την βιοσύνθεση των λευκοτριενών. (Dixon και συνεργάτες 1990, Miller και συνεργάτες 1990).

Οι λευκοτριένιες είναι προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές οι οποίοι παράγονται κυρίως στα φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα πολυμορφοπύρηνα, μακροφάγα και τα μαστοκύτταρα. Οι λευκοτριένιες πέραν του ότι έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες φλεγμονώδεις απαντήσεις τα τελευταία χρόνια έχουν εμπλακεί στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης (Silva και συνεργάτες 2002).

Την τελευταία 10-ετία αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την σημαντική θέση που καταλαμβάνει η φλεγμονή στην αθηροσκλήρωση, από τον σχηματισμό του αθηρώματος, έως στην ρήξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας, με απότοκο την θρόμβωση, την κυριότερη επιπλοκή της αθηροσκλήρωσης η οποία εν συνεχεία μπορεί να προκαλέσει ΑΕΕ και έμφραγμα. (Libby και συνεργάτες 2002)

Οι λευκοτριένιες έχουν ως φυσιολογικό ρόλο την έναρξη των ανοσολογικών απαντήσεων και αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει τον ρόλο τους στον ανοσολογικό αμυντικό μηχανισμό (Peters Golden, και συνεργάτες 2005) αλλά και την συμμετοχή τους σε φλεγμονώδεις παθήσεις όπως το άσθμα την αλλεργική ρινίτιδα και την αθηροσκλήρωση (Young, R.N 1999, Peters Golden M and Henderson W.R 2007, Funk, C.D 2005). Οι φαρμακευτικές θεραπείες έναντι των λευκοτριενών έχουν αποδώσει θετικά στην θεραπεία των νοσημάτων του αναπνευστικού συστήματος είτε μέσω της αναστολής της σύνθεσης τους, είτε δρώντας με εκλεκτικό

ανταγωνισμό στους υποδοχείς των λευκοτριενών. (Jilly F. Evans και συνεργάτες 2008).

Πιο συγκεκριμένα η σύνθεση των λευκοτριενών κατά ένα μεγάλο μέρος πραγματοποιείται στα λευκοκύτταρα και μπορεί να ενεργοποιηθεί από διάφορα ερεθίσματα. Ειδικότερα εστεροποιημένο αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται σε λευκοτριένη A4 από την δράση της ενεργοποιημένης 5-λιποξυγενάσης. Το ασταθές εποξείδιο λευκοτριένη A4 μεταβολίζεται σε λευκοτριένη B4 ή C4 από την υδρολάση της λευκοτριένης A4 ή της λευκοτριένης C4 συνθετάσης αντίστοιχα (Sala, A και συνεργάτες 1996, Dahinden, C.A και συνεργάτες 1985, Fiore, S. & Serhan, C.N. 1990).

Οι λευκοτριένιες που περιέχουν cysteinyl (λευκοτριένη C4 και τους μεταβολίτες της, λευκοτριένιες D4 και E4) αυξάνουν την διαπερατότητα των τριχοειδικών φλεβών και προκαλούν αγγειόσπασμο των στεφανιαίων αρτηριών (Burke, J.A και συνεργάτες 1982, Roth, D.M. & Lefler, A.M 1983, Wargovich, T και συνεργάτες 1985.). Επίσης η λευκοτριένη A4 μπορεί να μεταφερθεί στα γειτονικά κύτταρα όπου έτσι να λάβει μέρος η διακυτταρική τους σύνθεση.

Οι λευκοτριένιες έχουν διάφορες προ-φλεγμονώδης λειτουργίες (Ford-Hutchinson, A.W. 1990, Samuelsson, B. 1983). Η λευκοτριένη B4 ενεργοποιεί τα λευκά αιμοσφαίρια με αποτέλεσμα την αυξημένη συσσώρευση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων, απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων όπως η μυελοπεροξυδάση, και παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου (Zintzaras και συνεργάτες 2009).

Η σημαντικότητα της 5-LO οδού είναι αποδεδειγμένη στο άσθμα με ως αποτέλεσμα να έχουν αναπτυχθεί φάρμακα που εμποδίζουν την συγκεκριμένη οδό και ως εκ τούτου την καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου. Σχετικά

πρόσφατα έχει τραβήξει την προσοχή ο ρόλος της παραπάνω οδού στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Ιατροδικαστικές μελέτες έδειξαν αυξημένη έκφραση από μέρη της 5-LO οδού στις αθηροσκληρωτικές βλάβες της αορτής των στεφανιαίων αγγείων και των καρωτίδων. Επίσης 5-LO βρέθηκε στα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα καθώς και στα μαστοκύτταρα και πολυμορφοπύρρηνα και ιδιαίτερα στις πιο προχωρημένες βλάβες. Αξίζει να επισημανθεί ότι τα λευκοκύτταρα που περιείχαν το 5-LO συναθροίζονταν σε συγκεκριμένες περιοχές των αγγείων όπου είναι πιο ευαίσθητες στην ρήξη (Spanbroek, R. και συνεργάτες 2003). Ένας υπότυπος του 5-LO (promoter variant) είχε συσχετισθεί με παθολογική πάχυνση του ενδοθηλίου και του μέσου (intima-media) χιτώνα των καρωτίδων καθώς και με αύξηση των παραγόντων φλεγμονής. Επίσης ανταγωνιστές του LTB₄ αποκόπτουν την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης σε ποντίκια με έλλειψη της apo-E και της LDLR. (Mehrabian, M. και συνεργάτες 2002, Dwyer, J.H. και συνεργάτες, 2004).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα ανωτέρω μπορεί να υποστηριχθεί η ιδέα ότι όσο πιο αυξημένη δραστηριότητα υπάρχει στην 5-LO ουδό τόσο αυξάνεται η προδιάθεση για αθηροσκλήρωση ή αλλιώς η χρόνια προς τα άνω ρύθμιση της οδού των λευκοτριενών μπορεί να προσβάλλει τα αγγεία και ουσιαστικά να συνεισφέρει στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης και στην αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας. (Helgadottir A. και συνεργάτες 2004).

Επιπλέον, υποστηρίζεται ένας άλλος παθοφυσιολογικός μηχανισμός ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης με ως κοινό παρονομαστή τις λευκοτριένιες, πιο συγκεκριμένα: εάν υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα της πρωτεΐνης 5-λιποξυγενάσης θα μπορούσε να οδηγήσει σε συσσώρευση των λευκοτριενών στο λίπος του αγγειακού τοιχώματος. Η επακόλουθη ρήξη του συμπλέγματος

λευκοτριενών – λίπους από το ανοσολογικό σύστημα μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης με ως αποτέλεσμα την αύξηση του κινδύνου για ΑΕΕ (Helgadóttir A. και συνεργάτες 2004, Elkind και συνεργάτες 2001, Van Dijk και συνεργάτες 2005, Lõhmussaar E και συνεργάτες 2005, Domingues-Montanari S και συνεργάτες 2010)

Ενώ υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν τον ρόλο της 5 λιποξυγενάσης ενεργοποιό πρωτεΐνης (FLAP) και τον κίνδυνο ανάπτυξης ισχαιμικού ΑΕΕ στον αντίποδα υπάρχουν μελέτες που δεν βρήκαν συσχέτιση, (Zee RY και συνεργάτες 2006, Meschia JF και συνεργάτες 2005, Bondarenko EA και συνεργάτες 2011). Η αδυναμία συσχέτισης πιθανώς να οφείλεται ότι κάποιες μελέτες είχαν μικρό αριθμό ασθενών, την διαφορετικότητα των πληθυσμών, τις στρατηγικές που ακολουθήθηκαν για την συλλογή των ασθενών και ίσως την διαφορετική μεθοδολογία. (Zintzaras και συνεργάτες 2009).

Συγκεκριμένα σε μετά-ανάλυση μελετών παρατηρείται η διαφορετικότητα των πληθυσμών: εννέα μελέτες συμπεριέλαβαν λευκούς ασθενείς, μία μελέτη έγχρωμους, δύο μελέτες Ασιάτες και μία μελέτη μικτό πληθυσμό. Σε επτά μελέτες οι ερευνητές ανέφεραν πως όλοι οι ασθενείς είχαν ισχαιμικό ΑΕΕ, σε πέντε μελέτες ανέφεραν πως οι μάρτυρες είχαν καταγραφεί για την ηλικία και το φύλο, σε μόνο τρεις μελέτες οι ερευνητές κατέθεσαν τα αποτελέσματα τους ανάλογα με τους τύπους του ΑΕΕ των ασθενών. (Zintzaras και συνεργάτες 2009). Ως εκ τούτου οι μέχρι τώρα έρευνες δεν μπορούν να αποδείξουν τυχόν συσχέτιση του γονιδίου ALOX5AP με το ΑΕΕ με ως αποτέλεσμα να υφίστανται ανάγκη και άλλων μελετών με περισσότερη ομοιογένεια. (Zintaras E και συνεργάτες 2008).

Η πρώτη μελέτη διενεργήθηκε σε ασθενείς που υπέστησαν έμφραγμα του μυοκαρδίου καθώς και ΑΕΕ (μικρότερο αριθμό ασθενών). Αξίζει να σημειωθεί ότι

οι ασθενείς με ΑΕΕ δεν είχαν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με τον τύπο του ΑΕΕ που παρουσίασαν (που αποτελεί και διαφορετικό υπόστρωμα παθοφυσιολογίας) αλλά αποτελούσαν μια ομάδα ασθενών με σχεδόν όλων των τύπων του ΑΕΕ. Επίσης οι μελέτες που ακολούθησαν έγιναν σε ασθενείς με ΑΕΕ οι οποίοι ναι μεν είχαν κατηγοριοποιηθεί σύμφωνα με τα κριτήρια TOAST αλλά δεν υποβλήθηκαν σε εξ αρχής επαναδιερεύνηση των εξονίων αλλά αναζητήθηκαν οι μονονουκλεοτιδικές αλλαγές που είχαν βρεθεί στην πρωταρχική μελέτη που αποτελούνταν από μικτό πληθυσμό.

Η πολυπαραγοντική αιτιολογία του ΑΕΕ είναι λίγο κατανοητή και όσο αναφορά την παθογένεση το πιθανότερο οφείλεται σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών επιβαρυντικών παραγόντων παρά σε έναν πολυμορφισμό που μπορεί να επηρεάζει την εκδήλωση ΑΕΕ. Είναι αρκετά πιθανόν, η συνολική αλληλεπίδραση πολυμορφισμών συγκεκριμένων απλοτύπων να διαδραματίζει κυριότερο ρόλο για την ανάπτυξη ΑΕΕ παρά ένας μόνο πολυμορφισμός. Επιπλέον μπορεί να υπάρχουν άλλες λειτουργικές μεταλλάξεις στον γονίδιο *ALOX5AP* που να επηρεάζουν την προδιάθεση για ΑΕΕ. Επίσης, μπορεί να υπάρχουν και άλλοι πολυμορφισμοί στην οδό των λευκοτριενίων που να προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ΑΕΕ (Zintzaras και συνεργάτες 2009).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη απαρτίζεται από δύο σκέλη:

A. Σκοπός της μελέτης είναι η αναζήτηση συσχέτισης πολυμορφισμών στο γονίδιο *ALOX5AP* σε ασθενείς με Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Οι μελέτες έως τώρα προσπάθησαν να καταδείξουν την ύπαρξη συσχέτισης αλλά έχουν καταλήξει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η παρούσα μελέτη διενεργείται πρώτη φορά στον Ελληνικό πληθυσμό.

Έγινε ομαδοποίηση των ασθενών ανάλογα τον τύπο ΑΕΕ που παρουσίασαν και κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, Adams και συνεργάτες 1993).

Επίσης, διενεργήθηκε εξ αρχής διερεύνηση των εξονίων με διαφορετική μεθοδολογία (lightscanner melting analysis) αναζητώντας νέους πολυμορφισμούς, έχοντας βεβαίως υπ' όψιν τους πολυμορφισμούς που έχουν παρατηρηθεί στις προηγούμενες μελέτες.

Η πολυπαραγοντική αιτιολογία του ΑΕΕ δεν είναι ακόμη κατανοητή, πιθανότατα η παθογένεση οφείλεται στον συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντολογικών παραγόντων κινδύνου. Ως εκ τούτου, λόγω της διαφορετικότητας του πληθυσμού είναι σημαντική η επαναδιερεύνηση όλων των εξονίων ανά υποκατηγορία ΑΕΕ και στην συνέχεια σύγκριση με τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών που έχουν διενεργηθεί σε άλλους πληθυσμούς.

B. Επίσης, υπάρχει ένα δεύτερο και μικρότερο σκέλος της μελέτης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 16 ασθενείς όπου διερευνήθηκαν σε όλο το γονιδίωμα χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες συγκριτικού γεονωμικού υβριδισμού (array CGH).

Συγκεκριμένα προτιμήθηκαν 12 ασθενείς με συμπτωματική στένωση αγγείων, ενδοκράνια ή εξωκράνια, χωρίς όμως παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα, ΑΥ, ΣΔ, υπερλιπιδαιμία, αλκοόλ), στους οποίους προστέθηκαν τέσσερις ασθενείς που είχαν υποστεί αιμορραγικό ΑΕΕ. Όπως προαναφέρθηκε, η πολυπαραγοντική αιτιολογία του ΑΕΕ δεν είναι ακόμη κατανοητή, ως εκ τούτου η επιλογή των ανωτέρω ασθενών έχει ως σκοπό την τυχόν ύπαρξη πολυμορφικών ή μη ποικιλομορφιών αριθμού αντιγράφων (CNV-Copy Number Variations) –σε ασθενείς με ΑΕΕ, χωρίς όμως να έχουν τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου. Το ανωτέρω, έχει ενδιαφέρον, διότι ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός ανάπτυξης ΑΕΕ περιορίζεται πιο αυστηρά σε γενετικούς παράγοντες καθώς και τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των.

3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

A. ΠΡΩΤΗ ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Πρόκειται για 213 ασθενείς (145 άνδρες και 67 γυναίκες), (Πίνακας 1Α στο κεφάλαιο 5) συγκεκριμένα:

α) Ισχαιμικό ΑΕΕ είχαν υποστεί 43 ασθενείς λόγω αθηροσκλήρωσης μεγάλων αγγείων (εξωκράνιων ή ενδοκράνιων) εκ των οποίων 36 ήταν άνδρες και 7 γυναίκες.

β) Κενοχοριώδη έμφρακτα είχαν 87 ασθενείς εκ των οποίων 58 άνδρες και 29 γυναίκες,

γ) Καρδιοεμβολικά ΑΕΕ είχαν 14 ασθενείς εκ των οποίων 9 άνδρες και 5 γυναίκες

δ) Μη καθορισμένο ΑΕΕ είχαν 25 ασθενείς εκ των οποίων 20 άνδρες και 11 γυναίκες

ε) Αιμορραγικό ΑΕΕ είχαν 27 ασθενείς εκ των οποίων 17 άνδρες και 10 γυναίκες.

Στην παρούσα μελέτη έχει δοθεί βάρος στις δύο πρώτες κατηγορίες ασθενών, δηλαδή στους ασθενείς με ΑΕΕ στα πλαίσια στένωσης ή απόφραξης εξωκράνιων ή ενδοκράνιων αγγείων καθώς και στους ασθενείς με ΑΕΕ στα πλαίσια κενοχοριωδών εμφράκτων.

Ο τύπος του ΑΕΕ στους παραπάνω ασθενείς διαγνώσθηκε και κατατάχθηκε στις συγκεκριμένες υποκατηγορίες σύμφωνα με τα κριτήρια TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, Adams και συνεργάτες 1993).

Όλοι οι ανωτέρω ασθενείς δεν είχαν συγγένεια μεταξύ τους ενώ σε όλους διενεργήθηκε αξονική – μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (συμπεριλαμβάνονται και τομές μοριακής διάχυσης), ενώ σε κάποιους όταν υπήρχαν ενδείξεις διενεργούνταν μαγνητική αγγειογραφία εγκεφάλου.

Σε όλους διενεργήθηκε ηλεκτροκαρδιογράφημα, υπερηχογράφημα καρδιάς, υπερηχογραφική μελέτη αγγείων τραχήλου. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις ΑΕΕ γινόταν περαιτέρω διερεύνηση με διοισοφάγειο υπέρηχο καρδιάς, Holter ρυθμού 24-ώρου ή και έλεγχος θρομβοφιλίας.

Επίσης σε όλους τους ασθενείς διενεργήθηκε πλήρης αιματολογικός – βιοχημικός έλεγχος όπως γενική αίματος, σάκχαρο, ουρία, κρεατινίνη, τρανσαμινάσες, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, HDL, LDL, Κάλιο, Νάτριο, CPK, CRP, TKE.

Επιπλέον καταγράφονταν οι καπνιστές και η μη καπνιστές, ύψος, βάρος, κληρονομικό - ατομικό αναμνηστικό, η πιθανότητα ύπαρξης απνοιών ύπνου ή στεφανιαίας νόσου.

Η ομάδα των μαρτύρων αποτελούνταν από 210 ανθρώπους (μέση ηλικία 66 έτη, IQR 58-74 έτη) χωρίς βαθμό συγγένειας μεταξύ τους εκ των οποίων 110 ήταν άνδρες και 100 γυναίκες, διενεργήθηκε άντληση γενομικού DNA από αίμα-EDTA, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα εγκεκριμένα πρωτόκολλα. Οι μάρτυρες επιλέχθηκαν ώστε να ταιριάζουν με τους ασθενείς με το ΑΕΕ ως προς το φύλο και την ηλικία. Επίσης είχαν αρνητικό ατομικό αναμνηστικό για οποιουδήποτε τύπου ΑΕΕ (ακόμη και υποψία παροδικού ΑΕΕ) όπως και στεφανιαίας νόσου ή

αθηροσκληρωτικής νόσου μεγάλων αγγείων (συμπτωματική ή ασυμπτωματική). Επίσης προς ακόμη καλύτερη διαλογή των μαρτύρων, δεν γινόταν αιμοληψία σε ανθρώπους που ελάμβαναν αντί-αιμοπεταλιακή – αντιπηκτική φαρμακευτική αγωγή.

B. ΔΕΥΤΕΡΗ ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Επίσης, εκ των ανωτέρω ασθενών επιλέχθηκαν 12 που ανήκαν στην κατηγορία ΑΕΕ από αθηροσκλήρωση μεγάλων αγγείων (εξωκράνια-ενδοκράνια). Διερευνήθηκαν σε όλα τα γονίδια με μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενομικού υβριδισμού (array CGH).

Πιο συγκεκριμένα, είχαν ως κύριο χαρακτηριστικό της αιτιολογίας του ΑΕΕ την συμπτωματική απόφραξη ή στένωση καρωτίδας ή άλλης ενδοκράνιας αρτηρίας, χωρίς παράγοντες κινδύνου, δηλαδή υπέρταση, στεφανιαία νόσο, υπερλιπιδαιμία, σάκχαρο, κάπνισμα και με αρνητική διερεύνηση για καρδιολογικό νόσημα που να ευθύνεται για το ΑΕΕ. Συγκεκριμένα, 8 ασθενείς (4 άνδρες και 4 γυναίκες) είχαν εξωκράνια συμπτωματική στένωση καρωτίδας (εκ των οποίων οι 2 άνδρες και 1 γυναίκα είχαν απόφραξη καρωτίδας). Επίσης, 4 ασθενείς (3 άνδρες και 1 γυναίκα) είχαν συμπτωματική ενδοκράνια στένωση, και πιο συγκεκριμένα 1 άνδρας ασθενής με στένωση βασικής αρτηρίας και οι υπόλοιποι 3 ασθενείς με στένωση της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας). Επιπλέον, προστέθηκαν 4 ασθενείς (άνδρες) που είχαν υποστεί αιμορραγικό ΑΕΕ (2 ημισφαιρικά και 2 στα βασικά γάγγλια) με ως παράγοντα κινδύνου την αρτηριακή υπέρταση (ΠΙΝΑΚΑΣ 1B στο κεφάλαιο 5).

4.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

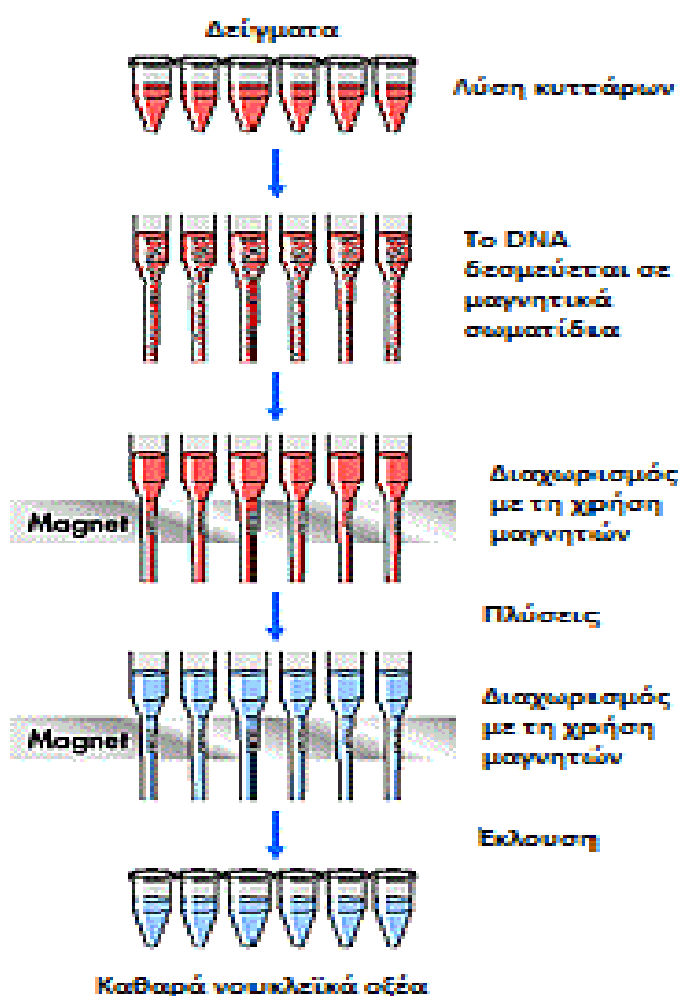
4.1 *ALOX5AP*

4.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών. Το αίμα συλλέχθηκε σε φιαλίδια όγκου 3mL με EDTA ως αντιπηκτικό. Το EDTA είναι ένας χηλικός παράγοντας που αναστέλλει την πήξη του αίματος, χωρίς να προκαλεί προβλήματα στην μετέπειτα ανάλυση του DNA που απομονώνεται, με μοριακές τεχνικές. Η απομόνωση του DNA έγινε με τη χρήση του αυτόματου ρομποτικού συστήματος απομόνωσης DNA της εταιρίας QIAGEN (BioRobot M48) σύμφωνα με το πρωτόκολλο MagAttract DNA Blood M48 Kit της ίδιας εταιρείας.

Το πρωτόκολλο MagAttract DNA Blood M48 Kit επιτρέπει την απόλυτα αυτοματοποιημένη απομόνωση ολικού DNA από το περιφερικό αίμα. Στη συνέχεια, το γενετικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας σε περαιτέρω μοριακές εφαρμογές και ενζυμικές αντιδράσεις. Η τεχνολογία MagAttract συνδυάζει την ταχύτητα και την ακρίβεια της απομόνωσης που βασίζεται στη χρήση επιφανειών πυριτίου, με την ευκολία στον χειρισμό των μαγνητικών σωματιδίων. Το DNA προσδένεται στην πυριτική επιφάνεια των μαγνητικών σφαιριδίων, παρουσία ενός

χαοτροπικού άλατος. Στη συνέχεια το προσδεμένο DNA ξεπλένεται με δύο ρυθμιστικά διαλύματα και με απιονισμένο νερό, το οποίο βελτιώνει την καθαρότητα του DNA. Τελικά, DNA υψηλής ποιότητας εκλύεται σε νερό που παρέχεται από την εταιρία. Το DNA που αποδίδει η τεχνική εξαρτάται από τον τύπο του δείγματος, τις συνθήκες φύλαξής του και την περιεκτικότητα του αίματος σε λευκοκύτταρα. Στην εικόνα 14 φαίνονται τα στάδια της μεθοδολογίας MagAttract DNA Blood M48.



Εικόνα 14: Απομόνωση DNA με τη χρήση του ρομποτικού συστήματος MagAttract DNA Blood M48.

4.3 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

4.3.1 Αρχή της μεθόδου

Μετά την απομόνωση του DNA από το ολικό αίμα, τα προς μελέτη τμήματα του γενετικού υλικού πολλαπλασιάστηκαν με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η αρχή της PCR συνοψίζεται στην *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με τη χρήση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Η PCR επιτρέπει την ενζυμική σύνθεση της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA, το οποίο μπορεί να έχει μέγεθος από 100 ζεύγη βάσεων έως περισσότερα από 2000 σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται πολλαπλά αντίγραφα (περίπου 1×10^9) ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, που οριοθετείται από τις αλληλουχίες των εκκινητών, ξεκινώντας ακόμη και από απειροελάχιστη ποσότητα υποστρώματος (1-2 κύτταρα). Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει συμπληρωματική αλυσίδα DNA σε κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA.

4.3.2 Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, απαιτούνται, εκτός από το DNA που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την παρασκευή αντιγράφων, η DNA πολυμεράση, μίγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$), ζευγάρια εκκινητών που καθορίζουν το μέγεθος των αντιγράφων DNA, ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει στοιχεία που βελτιστοποιούν την αντίδραση και τη δράση του ενζύμου και νερό. Το νερό παρέχει το υγρό περιβάλλον στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό.

Στην αντίδραση, που είχε τελικό όγκο 25 μL , χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Hotstart της εταιρίας QIAGEN, το οποίο περιέχει μια θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση. Η πολυμεράση αυτή, που απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο των θερμοπηγών *Thermus aquaticus*, είναι σταθερή σε θερμοκρασία 95°C και εισάγεται μόνο μια φορά στο μίγμα, στην αρχή της αντίδρασης. Εκτός από το ένζυμο, το συγκεκριμένο μίγμα περιέχει το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να εξασφαλίζεται το άριστο pH και η βέλτιστη ιονική ισχύς για την αντίδραση. Επίσης περιέχει MgCl_2 σε συγκέντρωση 1,5mM. Το MgCl_2 παρέχει στην αντίδραση τα δισθενή κατιόντα μαγνησίου που αποτελούν συμπράγοντες για ένζυμα όπως περιοριστικές ενδονουκλεάσες και πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στην τεχνική PCR. Πέρα από την αναγκαιότητά τους για τη λειτουργία του ενζύμου, τα ιόντα μαγνησίου σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, γεγονός που διευκολύνει την ενσωμάτωσή τους στην αλυσίδα του DNA και επιπλέον επηρεάζουν την αποδιάταξη των εκκινητών. Επιπρόσθετα, αυξάνουν την T_m (melting temperature), δηλαδή την θερμοκρασία κατά την οποία η μετάβαση από το δίκλωνο στο μονόκλωνο μόριο του DNA έχει πραγματοποιηθεί κατά 50%. Σε κάθε αντίδραση πρέπει να βρίσκεται η ιδανικότερη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις από την ιδανική συντελούν στην χαμηλότερη απόδοση της αντίδρασης, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις διευκολύνουν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Το μίγμα Hotstart περιέχει επίσης dNTPs, δηλαδή dATP, dTTP, dCTP και dGTP, σε ίσες συγκεντρώσεις. Η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου, η συγκέντρωση των εκκινητών, το μήκος των αντιγράφων του DNA και ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης. Τα dNTPs παρέχουν ενέργεια στην αντίδραση, με τις β και γ φωσφορικές ομάδες τους.

Ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών είναι καθοριστικός για την επιτυχία της αντίδρασης. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν συμπληρωματική αλληλουχία με τα μόρια του DNA στόχου. Το μήκος τους, που πρέπει να κυμαίνεται από 20- 30 bp, καθορίζει το T_m και κατά συνέπεια τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών με την συμπληρωματική τους αλληλουχία. Μικρότεροι εκκινητές μπορεί να συνδεθούν με άλλα τμήματα του DNA και να δώσουν μη ειδικά προϊόντα, ενώ μεγαλύτεροι μειώνουν την απόδοση της αντίδρασης. Το ποσοστό των βάσεων G+C δεν πρέπει να υπερβαίνει το 40-60% των βάσεων του εκκινητή. Σημαντική είναι και η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται. Υψηλότερες συγκεντρώσεις από την ιδανική για κάθε ζεύγος εκκινητή δίνουν μη ειδικά προϊόντα και διμερή των εκκινητών (primer-dimers). Επιπρόσθετα, απαραίτητο είναι να είναι γνωστή η T_m του κάθε εκκινητή. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ιδανική θερμοκρασία αναδιατάξεως είναι $3-5^{\circ}\text{C}$ μικρότερη της T_m . Γι' αυτό το λόγο κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών επιλέχθηκαν εκκινητές με παραπλήσιες τιμές της T_m . Ένας άλλος παράγοντας που διαδραματίζει πολύ σπουδαίο ρόλο στην πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι η συμπληρωματικότητα. Επαναλαμβανόμενες δομές με υψηλό ποσοστό των βάσεων G+C μπορεί να οδηγήσουν σε αναδιπλώσεις φουρκέτας (hairpin loops). Επίσης το 5' άκρο του κάθε εκκινητή δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικό με το 3' άκρο ούτε του ίδιου ούτε των άλλων εκκινητών, γιατί αυτό θα οδηγήσει στο σχηματισμό διμερών των εκκινητών. Επιπλέον οι εκκινητές δεν πρέπει να έχουν σε υψηλό ποσοστό ομολογία- και κυρίως στο 3' άκρο τους- με περιοχές του γονιδιώματος διαφορετικές από αυτήν που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα H/Y Primer3-web 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Με τη βοήθεια του προγράμματος αυτού βρέθηκαν οι καταλληλότεροι εκκινητές για τις συγκεκριμένες αλληλουχίες του

γονιδιώματος, προσδιορίστηκαν οι τιμές των T_m καθώς επίσης και το ποσοστό (G+C)%. Επιπρόσθετα για να εντοπιστούν πιθανές δευτεροταγείς δομές (αναδιπλώσεις, δομές φουρκέτας κλπ) καθώς επίσης και διμερή των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα H/Y IDT (Integrated DNA Technologies, www.idtdna.com). Οι αλληλουχίες των γονιδίων εντοπίστηκαν από τις βάσεις δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Στο 5' άκρο των δύο εκκινητών προστέθηκε ένα ολιγονουκλεοτιδικό τμήμα, που είναι γνωστό και ως M13 tail, το οποίο έχει συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους 17 νουκλεοτιδίων (M13F 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' και M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Το τμήμα αυτό χρησιμεύει για την επακόλουθη αλληλούχιση του DNA. Το μέγεθος του εκάστοτε PCR προϊόντος είχε άμεση σχέση με τις δυνατότητες του συστήματος αλληλούχισης που χρησιμοποιήθηκε και κυμάνθηκε περίπου από 200 bp έως 800 bp. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να απέχουν τουλάχιστον 40 bp από την έναρξη της κάθε κωδικοποιούσας περιοχής, προκειμένου να μην χαθεί πολύτιμη πληροφορία κατά την αλληλούχιση του DNA. Επιπλέον επιλέχθηκαν τα ζεύγη εκκινητών που είχαν παραπλήσιες τιμές T_m , ενώ η συγκέντρωσή τους στην αντίδραση ήταν 5μM. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο καθώς επίσης και το μέγεθος των προϊόντων PCR, παρουσιάζονται στον Πίνακα III

ALOX5AP

Κωδικοποιούσα περιοχή	αλληλουχία εκκινητών (Forward & Reverse)	Μέγεθος προϊόντος PCR
εξώνιο 1	.LX1F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT- gggcattttggtgtagt- 3' .LX1R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC- gacacaattgtttaagcctgac-3'	47 bp
εξώνιο 2	.LX2F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-tcaaggaggcatttaacattctagt- 3' .LX2R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC- atgtgttattaagggtgtca- 3'	82 bp
εξώνιο 3	.LX3F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-tgattattaactcaacttcaggtaattt- 3' .LX3R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC- ggtcaggcaaaagtccttcaa- 3'	59 bp
εξώνιο 4	.LX4F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT- caatgttgattgcctaattggg- 3' .LX4R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC- agccgtgaatctagtaataac- 3'	60 bp
εξώνιο 5	.LX5F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT- ccccatatatctaaaagggtgaaca- 3' .LX5R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC- gaagagcagaatgctctcaag-3'	42 bp

Πίνακας III: Καταγραφή αλληλουχιών εκκινητών forward και reverse που

χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδίου *ALOX5AP*

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές (Flexigene, TECHNE), που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα είναι το εξής:

1. Αποδιάταξη αρχικού δείγματος (denaturation): Το κάθε μείγμα θερμάνθηκε αρχικά στους 95⁰C για 15 min, ώστε να αποδιαταχθεί το DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή δευτεροταγών και τριτοταγών δομών και η διπλή έλικα να ανοίξει σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες.
2. Υβριδισμός (annealing): Η θερμοκρασία μειώθηκε στους 55⁰C στους 58⁰C (ανάλογα με την T_m των εκκινητών) για 40 sec ώστε να προσδεθούν οι εκκινητές στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Η θερμοκρασία αυτή είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (Πίνακας IV).
3. Προέκταση (extension) ή επιμήκυνση (elongation): Η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 72⁰C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπου και πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας τα dNTPs του διαλύματος. Ο χρόνος επώασης στο στάδιο αυτό ήταν 40 sec. Η τιμή του χρόνου επώασης εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιαστεί.
4. Αποδιάταξη προϊόντων: Η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 94⁰C για 40 sec, ώστε τα μικρά τμήματα του δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν να αποχωριστούν πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.

Στη συνέχεια επαναλήφθηκαν 32 κύκλοι των σταδίων 2-4. Η χρονική διάρκεια προέκτασης του τελευταίου κύκλου ήταν 8 min, προκειμένου να υπάρξει χρόνος για την επέκταση όλων των προϊόντων από τη DNA πολυμεράση. Κατά τη διάρκεια του πρώτου και του δεύτερου κύκλου, το παραγόμενο προϊόν είχε ενδιάμεσο μέγεθος ενώ από τον τρίτο κύκλο εμφανίστηκαν οι αλυσίδες του DNA που έχουν το επιθυμητό μέγεθος. Από αυτό το σημείο και πέρα, η παραγωγή προϊόντων επιθυμητού μεγέθους αυξήθηκε εκθετικά και στο τελικό προϊόν της

αντίδρασης ανιχνεύθηκαν μόνο μόρια συγκεκριμένου μεγέθους. Οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια της αντίδρασης PCR φαίνονται στους πίνακες V και VI

Γονίδιο	Περιοχή γονιδίου	Θερμοκρασία υβριδισμού
<i>ALOX5AP</i>	Εξώνια 1, 2, 3	58 ⁰ C
<i>ALOX5AP</i>	Εξώνια 4, 5	56 ⁰ C

Πίνακας IV: Θερμοκρασίες υβριδισμού που εφαρμόστηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	Αριθμός κύκλων
. Ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης	95 ⁰ C	15 min	1
. Αποδιάταξη, Υβριδισμός	94 ⁰ C	40 sec	32
εκκινητών Πολυμερισμός	58 ⁰ C ή 55 ⁰ C	40 sec	
	72 ⁰ C	40 sec	
. Τελική επέκταση	72 ⁰ C	8 min	1

Πίνακας V: Συνθήκες της αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήριο

Τελική συγκέντρωση

HotStarTaq

2.5 units HotStarTag DNA πολυμεράση

MasterMix

1.5mM MgCl₂

200μM από κάθε dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Εκκινητές

5μM

Πίνακας VI: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR.

4.3.3 Απόδοση αντίδρασης PCR

Η απόδοση της PCR είναι ιδιαίτερα σημαντική για την μετέπειτα επεξεργασία και χρήση της πολλαπλασιασμένης αλληλουχίας. Η θεωρητική απόδοση της PCR, η οποία καθορίζεται από τον αριθμό των αντιγράφων, μπορεί να εκφραστεί με τον τύπο $(2^{n-2}) \cdot x$, όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων ($n > 2$) και x ο αριθμός των μορίων DNA στο αρχικό δείγμα. Έτσι από ένα αρχικό μόριο δίκλωνου DNA προκύπτουν θεωρητικά 1.073.741.824 μόρια DNA επιθυμητού μήκους σε 32 κύκλους. Αυτό όμως προϋποθέτει απόδοση της αντίδρασης 100%, κάτι που δεν παρατηρείται ποτέ εξαιτίας μιας σειράς παραγόντων:

1. Η απόδοση του ενζύμου μειώνεται μετά από 25-30 κύκλου, αφενός εξαιτίας της περίσσειας μορίων DNA προς αντιγραφή και αφετέρου εξαιτίας της θερμικής αποδιάταξης του ενζύμου.
2. Με την αύξηση των αντιγράφων παρατηρείται ανταγωνισμός μεταξύ αυτών και των εκκινητών στη σύνδεση με τα μόρια του DNA-εκμαγείου.
3. Πολλές φορές υπάρχει αδυναμία διαχωρισμού του DNA από άλλα μακρομόρια καθώς και κακή ποιότητα του αρχικού DNA.

4. Η αποδιάταξη της διπλής έλικας δεν γίνεται σε όλα τα μόρια.

Η ενίσχυση του DNA δεν ακολουθεί καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης εκθετική πορεία. Αρχικά διακρίνεται μια φάση που δημιουργούνται αντίγραφα του μορίου-εκμαγείου. Στη συνέχεια ακολουθεί η εκθετική φάση, όπου το DNA αντιγράφεται με εκθετικό ρυθμό. Στο τέλος αυτής της φάσης, δημιουργείται ένα plateau, όπου ο αριθμός των μορίων DNA δεν αυξάνεται σημαντικά. Η χρονική στιγμή που εμφανίζεται το plateau εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων και την αρχική ποσότητα του DNA στο δείγμα. Η απόδοση της αντίδρασης μπορεί να επηρεάζεται, θετικά ή αρνητικά, από συστατικά που υπάρχουν στο βιολογικό δείγμα, από το οποίο προέρχεται το DNA ή από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωσή του από αυτά. Τα δείγματα DNA της εργασίας αυτής προέρχονται από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος το οποίο συλλέχθηκε σε συλλέκτες που περιέχουν EDTA ως συντηρητικό και όχι ηπαρίνη, αφού η τελευταία θεωρείται αναστολέας της αντίδρασης.

4.3.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να ελεγχθεί η επιτυχία της μεθόδου PCR τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πηκτώματα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες αγαροβιόζης. Κάθε μονάδα αγαροβιόζης αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γαλακτόζης και 3,6-ανυδρο-L-γαλακτόζης οι οποίες ενώνονται με $\alpha(1\rightarrow3)$ και $\beta(1\rightarrow4)$ γλυκοσιδικούς δεσμούς. Αυτές δημιουργούν ελικοειδείς ίνες που συσσωματώνονται σε υπερελικωμένες δομές με ακτίνα 20- 30 nm. Η αγαρόζη είναι συστατικό του άγαρ, το οποίο λαμβάνεται κυρίως από ροδοφύκη των γενεών *Gracilaria*, *Gelidium* και *Pterocladia*.

Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, τα προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με βάση το μέγεθος των μορίων του DNA. Κατά την παρασκευή του πηκτώματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 20xTBE και αγαρόζη Sekeam σε ποσοστό 1,5%, ενώ προστέθηκαν και σταγόνες βρωμιούχου αιθιδίου μέχρι το μίγμα ν' αποκτήσει πορτοκαλί χρώμα. Το βρωμιούχο αιθίδιο βοηθά στην χρώση του DNA μετά από επισκόπηση σε υπεριώδη ακτινοβολία λόγω της ιδιότητας του να ενσωματώνεται στην διπλή έλικα του μορίου. Έτσι καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός των σημείων όπου υπάρχει DNA, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε έχουμε ποιοτικό προσδιορισμό του προϊόντος. Για να προσδιοριστούν τα μεγέθη των μορίων του προϊόντος προστέθηκε παράλληλα στο πήκτωμα ποσότητα DNA-δείκτη μοριακού βάρους (M.W. DNA marker). Στα πηγαδάκια του πηκτώματος προστέθηκαν 5μL από το PCR προϊόν και 5μL φικόλης, η οποία χρωματίζεται μπλε κατά την επαφή των μορίων της με μόρια DNA και βοηθάει στη καταβύθιση του προϊόντος στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Επίσης σε ένα πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 5 μL φάγου ΦX174 (DNA/BsuRI, HaeIII) σαν δείκτης μοριακού βάρους. Το πήκτωμα ηλεκτροφορήθηκε στα 100V για 20min και παρατηρήθηκαν οι μπάντες με την χρήση συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας. Με την μέθοδο αυτή επιβεβαιώθηκε ότι ολοκληρώθηκε επιτυχώς ο πολλαπλασιασμός των επιθυμητών τμημάτων DNA στα προς μελέτη δείγματα.

4.3.5 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων τα οποία θα αποτελέσουν το υπόστρωμα για την αντίδραση της αλληλούχισης υπέστησαν μία διαδικασία καθαρισμού προκειμένου να γίνουν κατάλληλα για χρήση έτσι ώστε να απομακρυνθούν όλες οι

ανεπιθύμητες χημικές ουσίες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το MinElute 96 UF PCR Purification Kit της εταιρείας Qiagen.

Με το εν λόγω kit είναι εφικτός ο γρήγορος και εύκολος καθαρισμός των προϊόντων PCR, αφού μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλακίδια με 96 πηγαδάκια, τα οποία συγκρατούν τα προϊόντα PCR με τη βοήθεια μιας υπερδιηθητικής μεμβράνης. Οι πλατφόρμες που χρησιμοποιούνται επιτρέπουν τη γρήγορη και αποτελεσματική ανάκτηση των δίκλωνων θραυσμάτων DNA μεγέθους μεγαλύτερου ή ίσου από 100 bp και την ταυτόχρονη απομάκρυνση των εκκινητών, των αδέσμευτων νουκλεοτιδίων και των αλάτων.

Τα PCR προϊόντα τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια της πλατφόρμας υπερδιήθησης και εφαρμόστηκε αντλία κενού. Μόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως εκκινητές και άλατα, μπορούσαν να διαπεράσουν τη μεμβράνη, σε αντίθεση με τα μόρια του DNA, που παρέμειναν συγκρατημένα σε αυτήν. Τα καθαρά, πλέον, προϊόντα της PCR, που βρίσκονταν στην επιφάνεια της μεμβράνης, διαλύθηκαν σε μικρό όγκο νερού (20 μ L). Έτσι, προέκυψαν διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης DNA, με ποσοστά ανάκτησης 85%-95%, τα οποία ήταν έτοιμα να χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση αλληλούχισης που ακολούθησε.

Μετά τον καθαρισμό, μετρήθηκε η συγκέντρωση στα καθαρά PCR προϊόντα μέσω της μέτρησης της οπτικής τους πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο NanoDrop της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Η ακριβής συγκέντρωση των PCR προϊόντων υπολογίστηκε αφού αφαιρέθηκε η συγκέντρωση των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου στην κάθε αντίδραση. Για να βρεθούν τα fmoles σε κάθε αντίδραση PCR, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα H/Y Science Launcher (www.sciencelauncher.com/MWcalc.html). Στη συνέχεια, στα δείγματα με ποσότητα πάνω από 200 fmoles έγινε αραίωση με νερό. Επομένως, η τελική

ποσότητα σε κάθε δείγμα ήταν από 100 έως 200 fmoles. Η ποσότητα του DNA σε κάθε δείγμα PCR ήταν σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της αντίδρασης αλληλούχισης που ακολούθησε.

Εκτός από το πρωτόκολλο αυτό, σε ορισμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το σύστημα καθαρισμού ExoSAP-IT της εταιρίας Affymetrix. Το σύστημα αυτό είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την απομάκρυνση των dNTPs και των εκκινητών που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση PCR. Το ExoSAP-IT στηρίζεται στην χρήση δύο υδρολυτικών ενζύμων, της εξωνουκλεάσης I (exonuclease I) και της αλκαλικής φωσφατάσης (Shrimp alkaline phosphatase), προκειμένου να απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες χημικές ουσίες. Η εξωνουκλεάση καταστρέφει τα μονόκλωνα τμήματα DNA, από τους εκκινητές και από τα ατελή προϊόντα PCR και η αλκαλική φωσφατάση υδρολύει τα εναπομείναντα dNTPs που υπάρχουν στο μίγμα, ώστε να μην παρεμποδίζουν την αλληλούχιση των τμημάτων DNA που θα ακολουθήσει. Το μίγμα ExoSAP-IT, που περιέχει τα δύο ένζυμα, προστίθεται απευθείας στα προϊόντα PCR. Τα ένζυμα είναι ενεργά στο υγρό όπου είναι διαλυμένο το PCR και απενεργοποιούνται όταν θερμανθούν στους 80°C για 15 min. Αφού προστέθηκαν τα ένζυμα στα προϊόντα PCR, ακολούθησαν δύο στάδια επώσεων και στη συνέχεια τα δείγματα ήταν έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία. Οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια απεικονίζονται στους πίνακες VII και VIII. Σε σχέση με τον καθαρισμό μέσω διήθησης σε κενό, η διαδικασία αυτή είναι πιο απλή και πιο αποτελεσματική.

Αντιδραστήριο	ποσότητα
PCR προϊόντα	5μL
ExoSAP-IT	2μL

Συνολικός όγκος 7μL

Πίνακας VII: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων με το πρωτόκολλο ExoSAP-IT.

Διαδικασία ExoSAP-IT	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια
Επώαση	37 ⁰ C	15 min
Απενεργοποίηση ενζύμων	80 ⁰ C	15 min

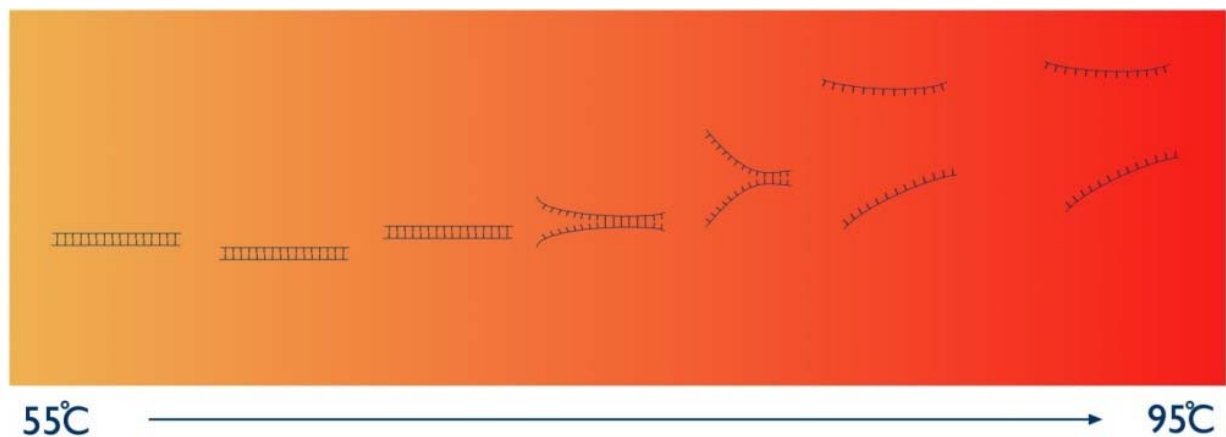
Πίνακας VIII: Στάδια που πραγματοποιήθηκαν κατά την διαδικασία καθαρισμού με το σύστημα ExoSAP-IT.

4.4 Μέθοδος υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξης του DNA (High Resolution Melting Analysis-HRMA)

Η υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξης (HRMA) βασίζεται στις ιδιότητες του DNA να υβριδίζεται και να αποδιατάσσεται. Αυτές οι ιδιότητες επέτρεψαν την ανάπτυξη πολλών κλινικών και γενετικών δοκιμασιών. Οι καθιερωμένες μέθοδοι για ανίχνευση και ταυτοποίηση βασίζονται στην ικανότητα υβριδισμού του DNA. Η πρόσδεση σημασμένων ανιχνευτών στο DNA, για την ανίχνευση μοναδικών

αλληλουχιών, χρησιμοποιείται στο PCR πραγματικού χρόνου (real-time), στη μεθοδολογία FISH καθώς και στις μικροσυστοιχίες υβριδισμού DNA.

Η μέθοδος βασίζεται στην βασική ιδιότητα του DNA να αποδιατάσσεται με θέρμανση, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής. Τυπικά αυτή η ανάλυση πραγματοποιούνταν μετά την PCR αντίδραση (post-PCR) σε PCR μηχανήματα πραγματικού χρόνου προκειμένου να διερευνηθεί η καθαρότητα του προϊόντος και οι αλλαγές της αλληλουχίας (με τη χρήση ανιχνευτών υβριδισμού). (εικόνα 15)



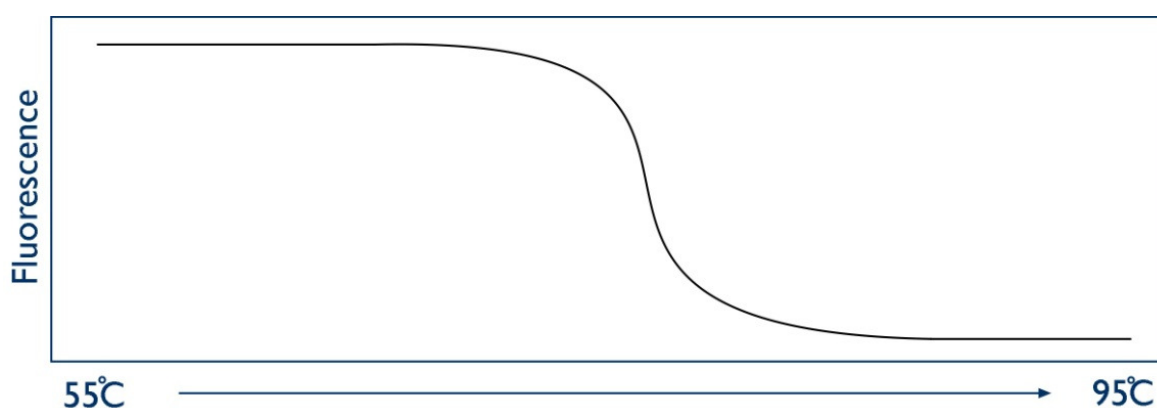
Εικόνα 15: Αποδιάταξη του DNA με αυξανόμενη θερμοκρασία

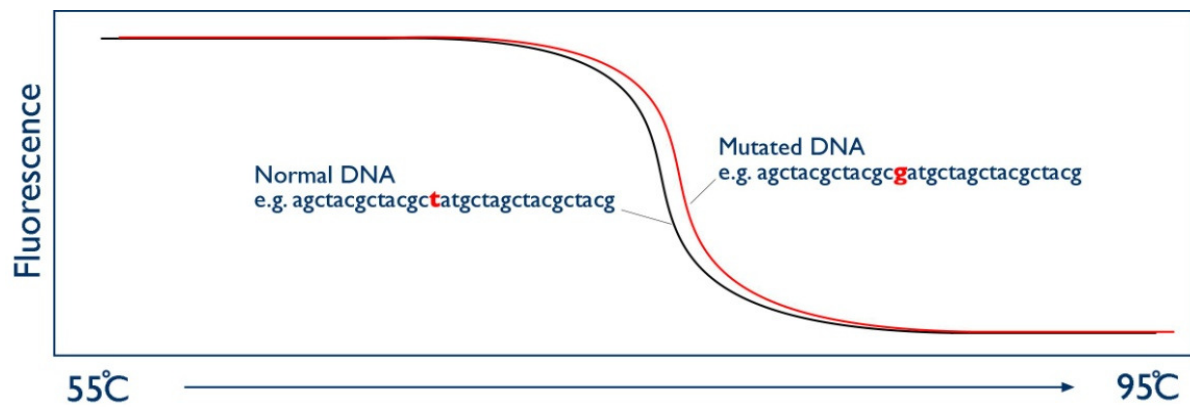
Η μέθοδος HRMA είναι απλή και γρήγορη μέθοδος. Βασίζεται στην αποδιάταξη του DNA και είναι δυνατή με τη χρήση φθορίζουσων χρωστικών που ενσωματώνονται στη διπλή έλικα και απελευθερώνονται όταν αυτή ανοίγει. Οι αλληλουχίες του DNA μπορούν να διαχωριστούν βάσει της σύστασής τους, του μήκους τους, του GC ή της συμπληρωματικότητάς τους. Η διαφορά της HRMA από την τυπική ανάλυση αποδιάταξης οφείλεται στα εξής:

1. **Χημεία** – Χρήση πιο φωτεινών χρωστικών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

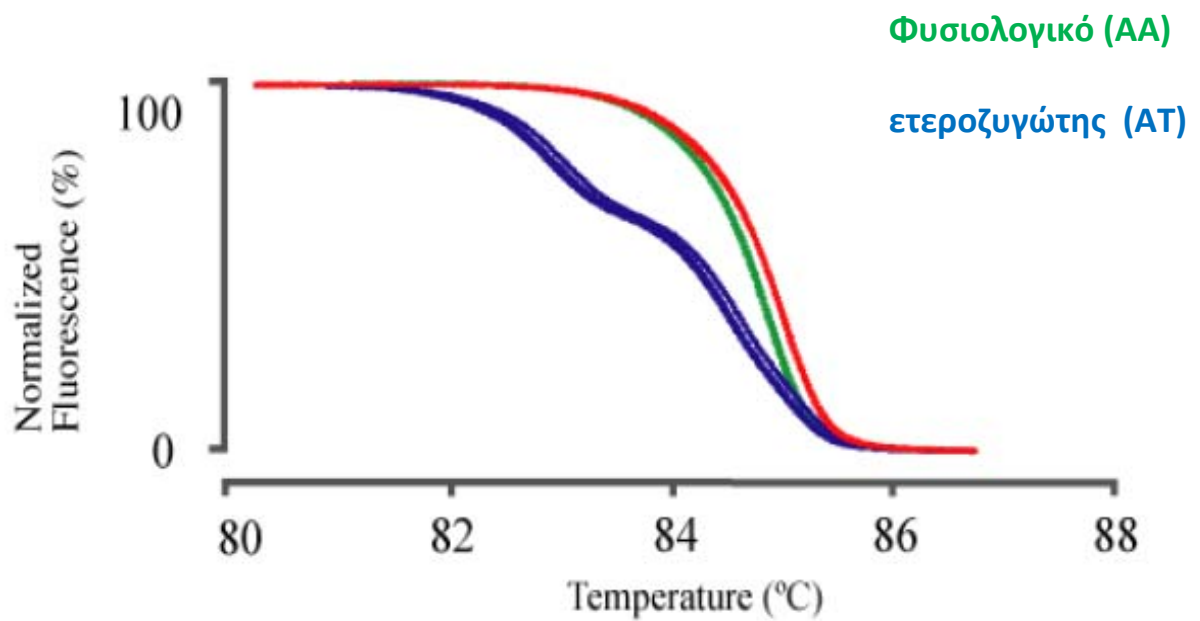
2. **Μηχανήματα** – απαιτεί τη χρήση μηχανημάτων που συλλέγουν δεδομένα φθορισμού υψηλής ευκρίνειας σε μικρές διαφορές θερμοκρασίας. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Light Scanner της εταιρείας Idaho Technology.
3. **Πρόγραμμα ανάλυσης (software)** – απαιτεί τη χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων ανάλυσης των δεδομένων με νέους αλγόριθμους.

Η ανάλυση ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό του DNA με την αντίδραση PCR παρουσία ειδικής χρωστικής που προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA. Η χρωστική έχει υψηλό φθορισμό όταν είναι προσδεδεμένη και χαμηλό όταν είναι ελεύθερη. Ακολουθεί υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξης με τη χρήση μηχανήματος ικανού να καταγράφει μεγάλο αριθμό δεδομένων φθορισμού σε κάθε θερμοκρασία με μεγάλη ακρίβεια. Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, δηλαδή όταν το DNA αποδιαταχθεί πλήρως (melts) η χρωστική απελευθερώνεται προκαλώντας αλλαγή στο φθορισμό. Το αποτέλεσμα είναι μια καμπύλη αποδιάταξης. Η σύσταση GC, το μήκος, η αλληλουχία και η ετεροζυγωτία παράγουν μια καμπύλη χαρακτηριστική για το προϊόν που αναλύθηκε (Εικόνα 16,17).



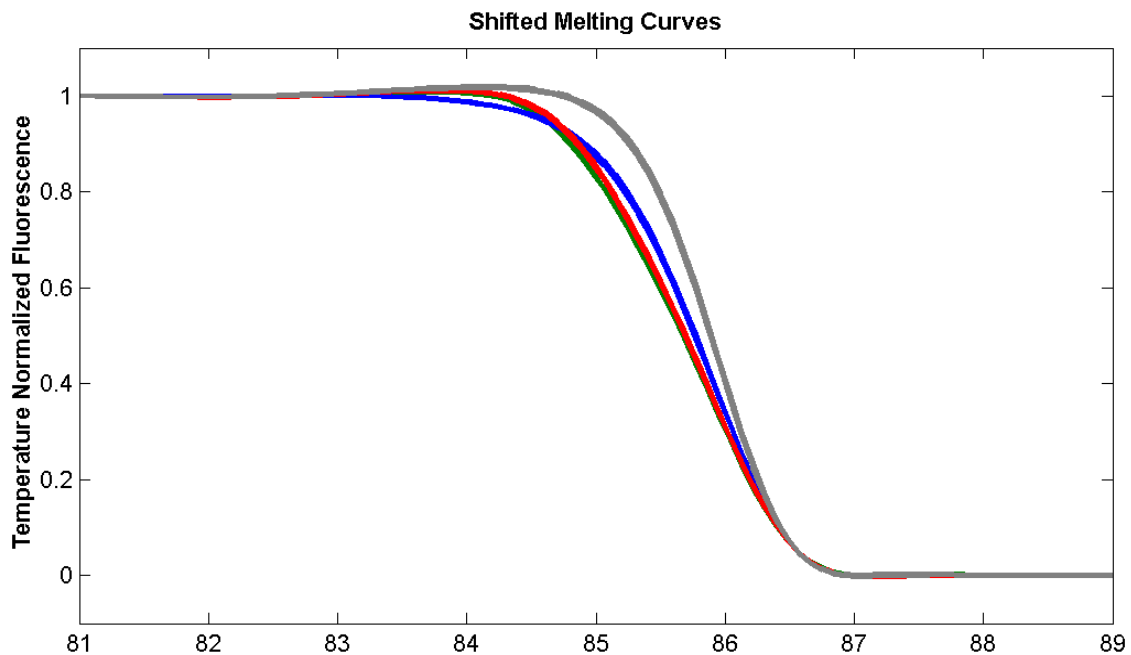


Εικόνα 16: Καμπύλες αποδιάταξης φυσιολογικού DNA και DNA με ετεροζυγωτία για αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου (SNP).



Εικόνα 17: Καμπύλες αποδιάταξης φυσιολογικού (πράσινη), ετεροζυγώτη για σημειακή μετάλλαξη (μπλέ) και ομοζυγώτη (κόκκινη)

Το δίκλωνο DNA (ds) αρχικά παρουσιάζει υψηλό φθορισμό ενώ στο T_m , το σημείο όπου 50% του προϊόντος είναι δίκλωνο (ds) και 50% είναι μονόκλωνο (ss), δηλαδή έχει αρχίσει να αποδιατάσσεται, ο φθορισμός πέφτει απότομα και τελικά έχουμε χαμηλός φθορισμός για ssDNA (εικόνα 18). Το σημείο T_m εξαρτάται από την αλληλουχία του προϊόντος DNA.

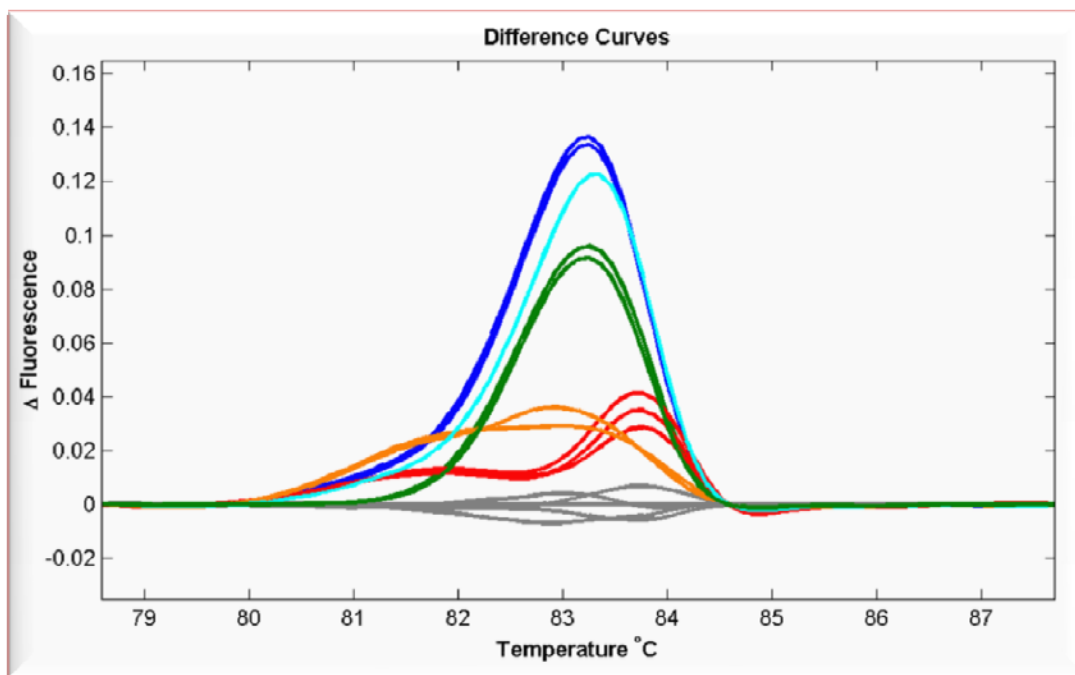


Εικόνα 18: Καμπύλες αποδιάταξης προϊόντων DNA με διαφορετικές μεταλλάξεις.

Όταν οι διαφορές μεταξύ των καμπύλων αποδιάταξης είναι μικρές οι διαφορές γίνονται πιο εμφανείς με την χρήση του λογισμικού (difference plot) όπου η καμπύλη κάθε δείγματος αφαιρείται από τη καμπύλη του δείγματος αναφοράς (συνήθως φυσιολογικό DNA-Wild Type) προκειμένου να τονιστούν οι διαφορές. Η μοναδικότητα της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι επιτρέπει τον ομογενή έλεγχο μεταλλάξεων σε ένα τυπικό πιάτο 96-θέσεων με τη χρήση φθορίζουσας κορεσμένης dsDNA χρωστικής (LCGreen) και Hi-Res Melting χωρίς να απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία. Η συσκευή Light-Scanner μπορεί να συλλέγει [117]

200 (data points/oC) δεδομένα φθορισμού από τους 55-95oC, με ρυθμό αλλαγής της θερμοκρασίας 0.1oC/sec. Η επιτυχία διαχωρισμού φυσιολογικού από το μεταλλαγμένο προϊόν DNA βασίζεται στη καλή ποιότητα του γενωμικού DNA, στο καλό σχεδιασμό των εκκινήτων για την αντίδραση PCR, το μέγεθος του προϊόντος και τη χρήση καλής φθορίζουσας χρωστικής. Η χαμηλή ποιότητα γενωμικού DNA μπορεί να παράγει μη ειδικά PCR προϊόντα οδηγώντας σε λάθος ανάλυση των αποτελεσμάτων ή αποτυχία της αντίδρασης. Όλα τα δείγματα σε ένα πείραμα πρέπει να έχουν απομονωθεί με το ίδιο πρωτόκολλο και να χρησιμοποιείται ίδιας συγκέντρωσης DNA. Συνιστάται να αναλύονται προϊόντα 100-300bp. Οι μεγάλες διαφορές μπορούν να ανιχνευτούν και σε προϊόντα >300bp, ενώ οι αλλαγές που δεν προκαλούν μεγάλες διαφορές (A>T) απαιτούν μικρά προϊόντα. Μπορούν να αποκαλυφθούν σημειακές αλλαγές (SNPs), αναστροφές, ελλείμματα και προσθήκες στο υπό ανάλυση προϊόν PCR. Χρησιμοποιήθηκε η χρωστική LCGreen PlusTM επειδή αποδείχθηκε πιο ευαίσθητη στο διαχωρισμό των προϊόντων PCR.

Με τη χρήση της πλατφόρμας Light Scanner έγινε ο έλεγχος (σάρωση) των ενισχυμένων με PCR αλληλουχιών για ανίχνευση αλλαγών της αλληλουχίας στα 5 εξόνια του γονιδίου *ALOX5AP*. Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονται δείγματα φυσιολογικής αλληλουχίας και γίνεται ανάλυση της αλληλουχίας σε δείγματα με πρότυπο φθορισμού (δηλαδή καμπύλη αποδιάταξης διαφορετική του φυσιολογικού) για την ταυτοποίηση της μετάλλαξης (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Παράδειγμα καμπυλών αποδιάταξης ενός προϊόντος PCR με διαφορετικές μεταλλάξεις (διαφορετικά χρώματα).

4.5 Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA

4.5.1 Αρχή της μεθόδου

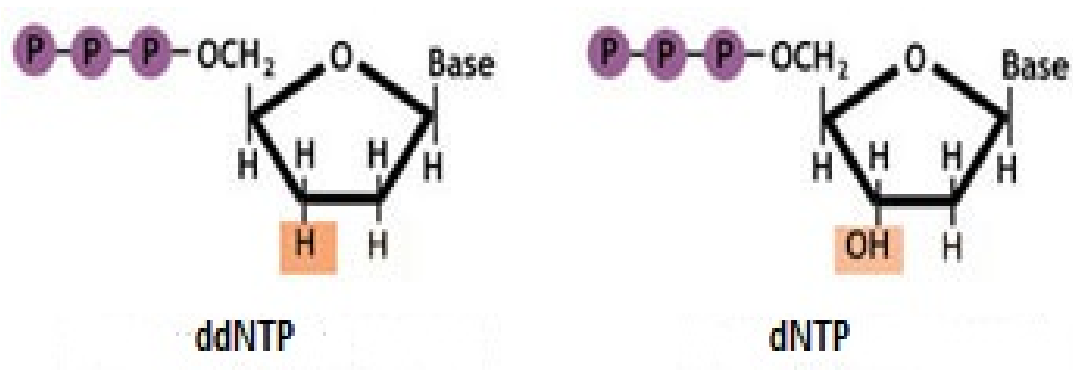
Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής για την εύρεση γενετικών αλλαγών έγινε με την μέθοδο της αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing). Στη διαδικασία αλληλούχισης υποβλήθηκαν τα δείγματα τα οποία κατά την διαδικασία HRMA έδειξαν πρότυπο αποδιάταξης διαφορετικό του φυσιολογικού. Η αλληλούχιση του DNA είναι μία μέθοδος, που επιτρέπει την ανάλυση και τον ακριβή προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής του DNA. Παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων ενός γονιδίου ή τμήματός του και ανίχνευσης αλλαγών σε αυτή, ακόμα και της αλλαγής μίας μόνο βάσης. Η μέθοδος αυτή είναι ταχύτατα εξελισσόμενη και πλέον υπάρχει η δυνατότητα προσδιορισμού της πρωτοταγούς δομής σε ολόκληρο το γονιδίωμα ή σε μεγάλα τμήματά του με τη

χρήση βελτιωμένων συστημάτων αλληλούχισης (next generation sequencing, Zhou et al. 2010).

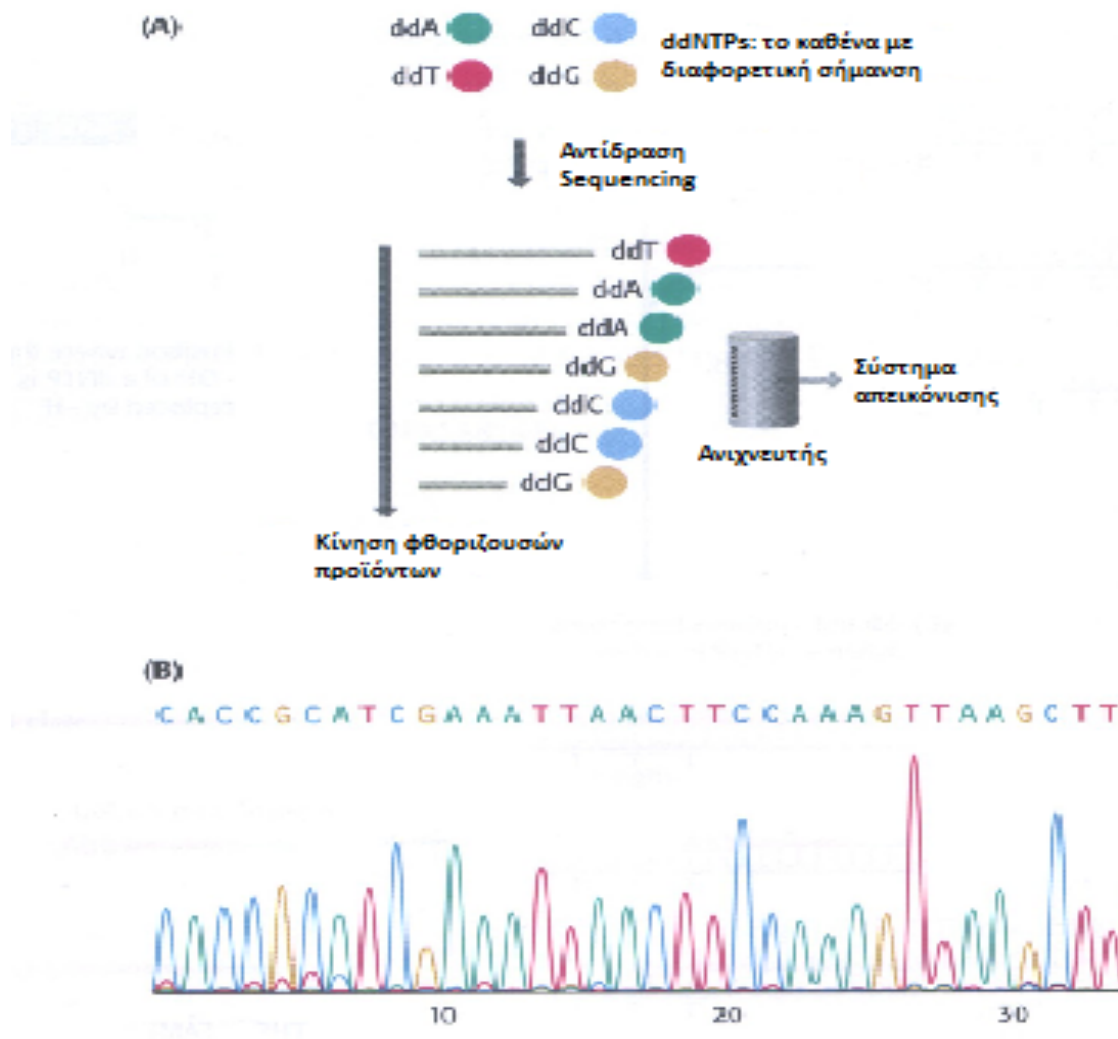
Η αλληλούχιση του DNA βασίζεται στην ενζυμική μέθοδο του Sanger. Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ο τερματισμός της σύνθεσης της νέας αλυσίδας σε συγκεκριμένες θέσεις, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να ανιχνευθούν. Αναλυτικότερα, στη μέθοδο αυτή η μία αλυσίδα χρησιμοποιείται ως μήτρα προκειμένου να συντεθεί η συμπληρωματική αλυσίδα, με πρόδρομα μόρια τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs) αλλά και με συγκεκριμένη ποσότητα από τα διδεοξυ- ανάλογά τους (ddNTPs). Η βασική δομή των dNTPs και ddNTPs παρουσιάζεται στην Εικόνα 20. Τα τριφωσφορικά 2', 3'-διδεοξυνουκλεοτίδια στερούνται των υδροξυλομάδων στα 2' και 3' άτομα άνθρακα αντίστοιχα, σε σχέση με τα δεοξυνουκλεοτίδια. Έτσι, μπορούν να ενσωματωθούν σε μία νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA μέσω της δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού με το προηγούμενο νουκλεοτίδιο. Πιο συγκεκριμένα, το 5' άτομο άνθρακα του ddNTP ενώνεται με το 3' άτομο άνθρακα του προηγούμενου νουκλεοτιδίου, αλλά δε μπορούν να σχηματίσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτίδιο διότι δε διαθέτουν την 3' υδροξυλομάδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να μην μπορούν να ενσωματωθούν άλλα ddNTPs στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα και επομένως διακόπτεται η σύνθεσή της στη θέση αυτή. Η αρχή της αλληλούχισης του DNA περιγράφεται σχηματικά στην εικόνα 21 A&B.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης sequencing απαιτείται το αρχικό τμήμα DNA, που λειτουργεί ως υπόστρωμα, μία DNA πολυμεράση και ένας εκκινητής, ο οποίος είναι συμπληρωματικός προς συγκεκριμένη περιοχή του υποστρώματος. Τέσσερις παράλληλες αντιδράσεις διεξάγονται, καθεμία ειδική για μία βάση (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη), χρησιμοποιώντας μίγμα των

τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων και των τεσσάρων διδεόξυ αναλόγων, σε συγκεκριμένη αναλογία. Η αναλογία dNTPs: ddNTPs καθορίζεται έτσι ώστε να προκύπτει ένα σύνολο τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους, με κοινό 5' άκρο και διαφορετικό 3' άκρο. Το 5' άκρο ορίζεται από τον εκκινητή, ενώ το 3' άκρο στο οποίο τερματίζεται η σύνθεση της αλυσίδας διαφέρει, γιατί η συγκέντρωση του ddNTP αναλόγου είναι μικρότερη από την αντίστοιχη του dNTP και η ενσωμάτωση του ddNTP γίνεται κάθε φορά τυχαία στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα.



Εικόνα 20: Απεικόνιση διδεοξυνουκλεοτιδίου (ddNTP) και δεοξυνουκλεοτιδίου (dNTP).



Εικόνα 21: (A) Απεικόνιση μεθοδολογίας sequencing κατά Sanger. (B) Παρουσίαση μιας τυπικής εικόνας αποτελεσμάτων από αλληλούχιση του DNA. Η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μία βάση.

4.5.2 Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης

Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδίου ALOX5AP έγινε με το MegaBACE SNP Genotyping System της εταιρίας GE Healthcare. Πρόκειται για ένα σύστημα ηλεκτροφόρησης μέσω τριχοειδών, που περιλαμβάνει το όργανο MegaBACE (εικόνα 22), τα απαραίτητα

αντιδραστήρια και το SNP Profiler λογισμικό. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία βασίζεται στο γεγονός ότι καθένα από τα τέσσερα είδη ddNTPs είναι σημασμένο με μία διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, η οποία ανιχνεύεται από ειδικό laser. Τα τριχοειδή περιέχουν μία μήτρα διαχωρισμού, η οποία συντίθεται από πολυακρυλαμίδη. Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί τη μετακίνηση των δειγμάτων κατά μήκος των τριχοειδών. Κατά την ηλεκτροφόρηση τα θραύσματα του DNA διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, με τα μικρότερα θραύσματα να μετακινούνται πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το λογισμικό παρέχει πληροφορίες για την αλληλουχία του DNA σε κάθε τριχοειδές ξεχωριστά.

Η πειραματική διαδικασία της αλληλούχισης του DNA περιλαμβάνει, αρχικά, την αντίδραση που λαμβάνει χώρα στον θερμοκυκλοποιητή. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν σε όλες τις κωδικοποιούσες περιοχές παρουσιάζονται στον Πίνακα III. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, forward ή reverse, που προσδένονται στην ουρά M13 των PCR προϊόντων. Αυτοί οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα εξώνια.

Τα προϊόντα της αντίδρασης που προκύπτουν καθαρίζονται με χρήση αιθανόλης και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, προκειμένου να απομονωθεί όσο το δυνατόν καθαρότερο διάλυμα DNA. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, με πλήρως αυτοματοποιημένο τρόπο, στο μηχάνημα του MegaBACE με συνθήκες που προσαρμόζονται κάθε φορά στο μέγεθος των θραυσμάτων που ηλεκτροφορούνται. Το ηλεκτροφόρημα που προκύπτει αποτελείται από ένα σύνολο καμπυλών τεσσάρων χρωμάτων, καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε μία αζωτούχο βάση. Το σύστημα MegaBACE έχει τη δυνατότητα αλληλούχισης έως και 96 δειγμάτων σε χρονικό διάστημα δύο ωρών (εικόνα 23).

Θερμοκρασία	Αριθμός κύκλων	Χρόνος
95 C	25	30 sec
55°C		30 sec
72°C		1 min

Εικόνα 23: Καταγραφή των συνθηκών που εφαρμόστηκαν στην αντίδραση αλληλούχισης.



Εικόνα 22: Απεικόνιση του αυτοματοποιημένου συστήματος MegaBACE.

4.6 Μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενομικού υβριδισμού (array CGH)

4.6.1 Αρχή της μεθόδου

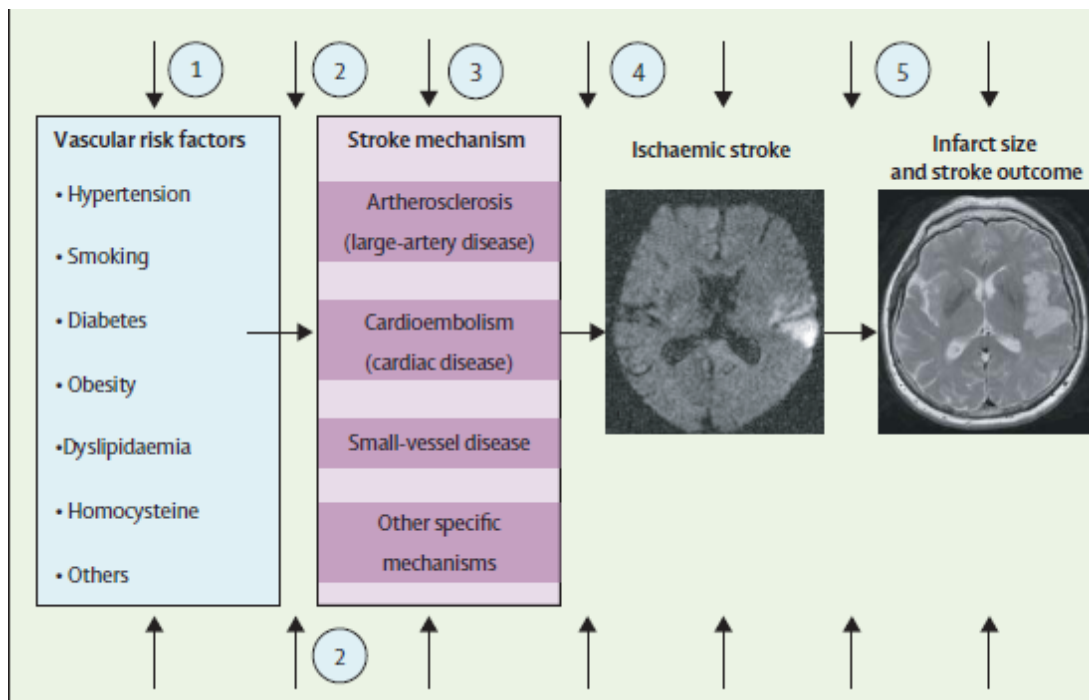
Η τεχνολογία του συγκριτικού γενομικού υβριδισμού (array CGH) έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια και βασίζεται στις μικροσυστοιχίες DNA. Η χρησιμότητά της έγκειται στην αποκάλυψη και χαρτογράφηση αλλαγών των αντιγράφων του DNA (Copy Number Variations, CNV). Τα μικροελλείμματα ή οι μικροδιπλασιασμοί που προκύπτουν μπορεί να έχουν παθολογική συνέπεια ή να είναι απλά φυσιολογικές πολυμορφικές αλλαγές που αποτελούν μια νέα πηγή ποικιλομορφίας του ανθρώπινου γονιδιώματος (Iafrate και συν 2004, Sebat και συν 2004, Redon και συν 2006). Τα CNVs μπορεί να προέλθουν από προσθήκη, ή έλλειμμα, ή διπλασιασμό χρωμοσωμικών περιοχών, με μέγεθος από μερικές κιλοβάσεις (Kb) έως πολλές μεγαβάσεις (Mb). Συσχετίζονται με περίπου 6500 περιοχές που είναι διασκορπισμένες σε όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα, το οποίο χαρακτηρίζεται ως χρωμοσωμικά πολυμορφικό σε ποσοστό 20%. Οι πολυμορφικές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (προσθήκες, ελλείμματα, διπλασιασμοί γενετικού υλικού) μπορεί να έχουν τις εξής συνέπειες α) πιθανή επίπτωση στον αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου με συνέπεια τη μεταβολή της σύνθεσης της πρωτεΐνης (gene dosage), β) κατάργηση της λειτουργίας γονιδίων, γ) αλλαγή της δομής γονιδίων, δ) απορύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε παθολογικούς φαινοτύπους.

Με την τεχνική array CGH συγκρίνεται ο αριθμός αντιγράφων DNA (CNVs) ενός γονιδιώματος δείγματος αναφοράς (control) με εκείνο ενός ασθενούς, μέσω διαφορετικής σήμανσης του γενομικού DNA με διαφορετικά φθοριοχρώματα. Τα ιχνηθετημένα δείγματα υβριδίζονται ανταγωνιστικά πάνω σε συστοιχία αλληλουχιών DNA, στέρεα ακινητοποιημένων σε γυάλινα πλακίδια- και όχι σε

μεταφασικά χρωμοσώματα- και ακολούθως αναλύεται ο λόγος των φθοριοχρωμάτων που προκύπτει. Κατά συνέπεια, η τεχνική array CGH είναι καθαρά μοριακή με κυτταρογενετικές εφαρμογές και αντιπροσωπεύει μέθοδο υβριδική.

Το κύριο πλεονέκτημα των a-CGH είναι η ικανότητα να ανιχνεύουν οποιαδήποτε ποσοτική αλλαγή στο DNA, όπως ανευπλοειδίες, ελλείμματα και διπλασιασμούς, με αναλυτική ευχέρεια κατά πολύ ισχυρότερη (10-10000 φορές) από τον κλασικό καρυότυπο, ανάλογα με το μέγεθος του στόχου και την κάλυψη και τη πυκνότητα των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται. Μικροσυστοιχίες που σχεδιάστηκαν με ολιγονουκλεοτίδια ανιχνευτές μπορεί να εντοπίσουν διπλασιασμούς ή απώλειες λίγων κιλοβάσεων (Kb). Επιπροσθέτως, η ικανότητα των array CGH να «ανακρίνουν» εκατοντάδες ή χιλιάδες διαφορετικούς γενετικούς τόπους συγχρόνως με μία μόνο εξέταση, έχει ισχυρά πλεονεκτήματα.. Η εξαιρετικά αναλυτική αυτή μεθοδολογία των array CGH, η οποία επιπλέον εύκολα μπορεί να αυτοματοποιηθεί, παρουσιάζει το επιπρόσθετο πλεονέκτημα και απαιτεί μικρή ποσότητα γενομικού DNA (300ng-1μg) για την ανάλυση.

Η μεθοδολογία των array-CGH έχει αρχίσει πρόσφατα να εφαρμόζεται σε πολυπαραγοντικά νοσήματα για την εύρεση πολυμορφισμών αριθμού αντιγράφων (CNVs) σε ολόκληρο το γονιδίωμα, τα οποία μπορεί να αποτελούν παράγοντα κινδύνου σε αυτά τα νοσήματα. Τα Αγγειακά Εγκεφαλικά επεισόδια (ΑΕΕ) ανήκουν στην ομάδα των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Το γενετικό υπόστρωμα μπορεί να έχει επίδραση σε πολλά επίπεδα και με διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. (εικόνα 24).



Εικόνα 24: Παράγοντες (περιβαλλοντικοί και γενετικοί) που επηρεάζουν/ αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης των ΑΕΕ.

Η ύπαρξη των CNVs μπορεί να επηρεάσει την έκφραση ομάδας γονιδίων, και με τον τρόπο αυτό να συνεισφέρουν αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης των ΑΕΕ. Σηματοδοτικά μονοπάτια που μπορεί να επηρεαστούν είναι αυτά της υπέρτασης, του διαβήτη ή και των σηματοδοτικών μονοπατιών των παραγόντων φλεγμονής. Μπορεί ακόμη και να επηρεάσουν την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον όπως π.χ. αύξηση του κινδύνου σε καπνιστές μέσω αυξητικής δράσης σε παράγοντες φλεγμονής. Τελικά τα CNVs έχουν την δυνατότητα να επηρεάσουν το γενετικό υπόστρωμα και να επισπεύσουν την εκδήλωση του ΑΕΕ, να προκαλέσουν αύξηση των ισχαιμικών εμφράκτων μετά την αθηρωματική εμβολή μεσαίου και μικρού μεγέθους αγγείων.

Το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής διαθέτει από το 2008 το σύστημα της εταιρείας Agilent, μίας εκ των 4 διεθνώς αναγνωρισμένων εταιρειών παραγωγής

μικροσυστοιχιών. Οι Agilent DNA συστοιχίες που χρησιμοποιήθηκαν (4X180K CGH+SNP arrays) είναι υψηλής ευκρίνειας μικροσυστοιχίες. Παρέχουν κάλυψη των κωδικοποιουσών (~7.4Kb απόσταση παρακείμενων ανιχνευτών) και μη κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος (16.5Kb απόσταση παρακείμενων ανιχνευτών) [gene oriented arrangement]. Οι υψηλής ευκρίνειας μικροσυστοιχίες έχουν την δυνατότητα κάλυψης του ~99% των γονιδίων ≥ 3 ανιχνευτές. Οι συγκεκριμένες μικροσυστοιχίες παρέχουν επιπλέον την δυνατότητα ελέγχου SNPs (συγκεκριμένων μονονουκλεοτιδικών αλλαγών σε όλο το γονιδίωμα) για την αποκάλυψη έλλειψη ετεροζυγωτίας (LOH). Δηλαδή μεγάλων περιοχών του γονιδιώματος (>6Mb) όπου όλοι οι πολυμορφικοί δείκτες (SNPs) βρίσκονται σε ομοζυγωτία. Η σημασία έλλειψης ετεροζυγωτίας έγκειται στο γεγονός αποκάλυψης έλλειψης ενός αντιγράφου ενός ή περισσότερων γονιδίων. Το γεγονός αυτό έχει σημασία εάν πρόκειται για απλό-ευαίσθητα γονίδια που έχουν ενοχοποιηθεί για κάποιο νόσημα (επικρατές) και το άλλο αντίγραφο περιέχει μετάλλαξη (υπολειπόμενο) ή εάν πρόκειται για γονίδια τα οποία έχουν συσχετισθεί με αύξηση κινδύνου εμφάνισης πολυπαραγοντικών νοσημάτων.

4.6.2 Διαδικασία της μεθόδου array CGH

Η τεχνική array-CGH απαιτεί τον εξειδικευμένο εξοπλισμό ενός εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής καθώς και απομονωμένους χώρους από το σύστημα κλιματισμού σε ένα περιβάλλον χαμηλών επιπέδων υγρασίας και όζοντος, απουσία φωτός.

Το εργαστηριακό πρωτόκολλο a-CGH περιλαμβάνει αρχικά απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα (φρέσκο ή κατεψυγμένο) με στήλες του Kit Qiagen. Ακολουθεί έλεγχος της καθαρότητας και μέτρησης της συγκέντρωσης

DNA με τη χρήση του Nano Drop ND-1000 UV-Vis σπεκτροφωτόμετρου. Τα επόμενα βήματα γίνονται με το περιεχόμενο του Agilent Oligo CGH Microarray Kit. Το γενωμικό DNA πέπτεται με 2 περιοριστικά ένζυμα, AluI και RsaI και έπειτα πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε 0.8% πήκτωμα αгарόζης για επιβεβαίωση της κοπής του DNA. Την πέψη ακολουθεί σήμανση των γενωμικών DNA δειγμάτων με φθοριοσημασμένα νουκλεοτίδια τυχαίων εκκινητών και το exo-Klenow τμήμα. Το εξεταζόμενο δείγμα του ασθενή σημαίνεται με Cy5 φωτοευαίσθητη φθορίζουσα χρωστική, ενώ το δείγμα αναφοράς με Cy3 χρωστική. Έπεται ανάμιξη των 2 δειγμάτων DNA, τα οποία υβριδίζονται με το περιεχόμενο των μικροσυστοιχιών (60μερή ολιγονουκλεοτίδια), τα οποία αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το γονιδίωμα. Η υβριδοποίηση ακολουθείται από πλύσεις με τα κατάλληλα Oligo aCGH διαλύματα και άμεση ανίχνευση/σάρωση των πλακιδίων με χρήση του λογισμικού Agilent Scanner Software version 7.0. Τα δεδομένα συλλέγονται με την μορφή εικόνας τύπου .tif, επιτρέποντας την μέτρηση των αλλαγών του DNA (μικροελλείψεις, διπλασιασμοί), η ανάλυση γίνεται με το ειδικό λογισμικό Cytogenomics 2.0.



Εικόνα 25: Ο Agilent σαρωτής για τη σάρωση μέχρι και 48 μικροσυστοιχιών διαφόρων τύπων

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ALOX5AP*

Στην παρούσα μελέτη με την μέθοδο υψηλής ευκρίνειας ανάλυσης αποδιάταξης του DNA (High Resolution Melting Analysis-HRMA) εξετάσθηκε ολόκληρη η κωδικοποιούσα περιοχή καθώς και οι γειτονικές ιντρονικές περιοχές του γονιδίου *ALOX5AP* σε 213 ασθενείς με ΑΕΕ και σε 210 υγιείς μάρτυρες ίδιας εθνικότητας. Στα δείγματα με διαφορετικό του φυσιολογικού πρότυπο έγινε αλληλούχηση DNA της συγκεκριμένης περιοχής. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον ΠΙΝΑΚΑ 1. Το ποσοστό των ανδρών ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα των ΑΕΕ (68,4%) σε σύγκριση με των ανδρών μαρτύρων (52,4). Υπήρχε σημαντική διαφορά των δύο ομάδων στην ηλικία ($p\text{-value}<0,001$) (ΠΙΝΑΚΑΣ 2)

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΑΕΕ

	TOAST κατηγοριοποίηση							
	Νόσος μεγάλων Αγγείων (LAA) N(%) (Σύνολο=43)	Καρδιοεμβολικά (CE) N(%) (Σύνολο=14)	Κενοτωπιώδη έμφρακτα (SVO) N(%) (Σύνολο=87)	Άλλα συγκεκριμένης αιτιολογίας (PFO, cadasil, etc) N(%) (Σύνολο=12)	Κρυπτογενή ΑΕΕ N(%) (Σύνολο=31)	Παρεγχυματική αιμορραγία (ICH) N(%) (Σύνολο=27)	Total (Σύνολο=213)	p- value
ΦΥΛΟ								
Γυναίκες	7 (10.4)	3 (4.5)	29 (43.3)	7 (10.4)	11 (16.4)	10 (14.9)	67	0.088
Άνδρες	36 (24.8)	9 (6.2)	58 (40.0)	5 (3.4)	20 (13.8)	17 (11.7)	145	
ΥΠΕΡΤΑΣΗ								
	33 (22.4)	12 (8.2)	64 (43.5)	1 (0.7)	17 (11.6)	20 (13.6)	147	<0.001
Κ.ΜΑΡΜΑΡΥΓΗ								
	6 (23.1)	10 (38.5)	9 (34.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.8)	26	<0.001
ΗΜΙΚΡΑΝΙΑ								
	3 (30.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	3 (30.0)	3 (30.0)	0 (0.0)	10	0.003
ΚΑΠΝΙΣΜΑ								
	26 (24.3)	5 (4.7)	42 (39.3)	8 (7.5)	18 (16.8)	8 (7.5)	107	0.102
Σ. ΔΙΑΒΗΤΗΣ								
	17 (29.3)	5 (8.6)	22 (37.9)	0 (0.0)	9 (15.5)	5 (8.6)	58	0.074
ΣΤΕΦ.ΝΟΣΟΣ								
	10 (27.8)	4 (11.1)	10 (27.8)	0 (0.0)	6 (16.7)	6 (16.7)	36	0.121
ΛΙΠΙΔΙΑ								
	31 (24.0)	7 (5.4)	55 (42.6)	2 (1.6)	20 (15.5)	14 (10.9)	129	0.040
ΑΛΚΟΟΛ								
	13 (26.5)	2 (4.1)	23 (46.9)	1 (2.0)	4 (8.2)	6 (12.2)	49	0.378
rs41351946								
CC	40 (19.5)	13 (6.3)	84 (41.0)	12 (5.9)	29 (14.1)	27 (13.2)	205	0.724
CT	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2	
rs4769055								
CC	20 (15.3)	9 (6.9)	61 (46.6)	8 (6.1)	17 (13.0)	16 (12.2)	131	0.195
CA	17 (29.3)	4 (6.9)	17 (29.3)	4 (6.9)	10 (17.2)	6 (10.3)	58	
AA	3 (16.7)	0 (0.0)	8 (44.4)	0 (0.0)	2 (11.1)	5 (27.8)	18	
rs3803277								
CC	14 (14.3)	1 (1.0)	56 (57.1)	9 (9.2)	10 (10.2)	8 (8.2)	98	<0.001
CA	19 (22.4)	9 (10.6)	25 (29.4)	3 (3.5)	14 (16.5)	15 (17.6)	85	
AA	7 (29.2)	3 (12.5)	5 (20.8)	0 (0.0)	5 (20.8)	4 (16.7)	24	
rs202068154								
AA	40 (19.5)	13 (6.3)	85 (41.5)	12 (5.9)	29 (14.1)	26 (12.7)	205	0.619
AC	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	1	
CC	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	
	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	p- value
Ηλικία(μέση)	61.0 (54.0, 67.0)	68.0 (61.5, 78.5)	63.0 (50.0, 72.0)	30.0 (26.0, 56.0)	50.0 (42.0, 63.0)	63.0 (56.0, 72.0)	61.0 (50.0, 69.0)	<0.001

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Σύγκριση** των ασθενών με ΑΕΕ με τους μάρτυρες για τις διαφορετικές μονονουκλεοτιδικές αλλαγές του γονιδίου πολυμορφισμούς *ALOX5AP*

	Odds Ratio	95% confidence interval	P value
ΦΥΛΟ			
Γυναίκες*	1		
Άνδρες	1.927	(1.214, 3.060)	0.005
Ηλικία(central 64)			
Ανά έτος	0.95	(0.931, 0.968)	<0.001
rs4769055, c.70+18C/A			
CC*	1		
CA	0.551	(0.328, 0.925)	0.024
AA	0.085	(0.046, 0.158)	<0.001
rs202068154, c.170+44A/C			
AA*	1		
AC/CC	0.150	(0.030, 0.753)	0.021

* γονότυπος αναφοράς** multivariate logistic regression analysis

Ανιχνεύθηκαν τέσσερα διαφορετικά SNPs εκ των οποίων το ένα ήταν συνώνυμη αντικατάσταση στο εξόνιο 2 του γονιδίου και τα άλλα τρία εντοπίστηκαν στα ιντρόνια 1 και 2 (Πίνακας 3). Η πλειοψηφία των δειγμάτων και από τις δύο ομάδες έφερε περισσότερο από ένα SNP με 31,5% των ασθενών και 44,4% των υγιών μαρτύρων να έχουν άγριου τύπου αλληλουχία σε όλες τις περιοχές στις οποίες έγινε αλληλούχηση DNA του γονιδίου. Η κατανομή των SNPs είχε ισορροπία Hardy-Weinberg και στις δύο ομάδες.

Χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία in silico (EX SKIP and Human Splicing Finder-HSF) (Desmet et al 2009, Raponi et al 2011) για να καθορισθεί εάν οι μονονουκλεοτιδικές αυτές αλλαγές στην αλληλουχία του γονιδίου *ALOX5AP* επηρεάζουν το μάτισμα των εξονίων. Συγκεκριμένα μόνο το αλλήλιο με την μικρότερη συχνότητα (MAF) c.123T του SNP rs41351946 (p.S41S, c.123C/T) παρουσιάζει περισσότερες πιθανότητες να επηρεάζει το σωστό μάτισμα του

εξονίου 2 (Πίνακας 3) και κατ'αυτόν τον τρόπο πιθανόν να μειώνεται η παραγωγή λειτουργικής ALOX5AP πρωτεΐνης. Οι συχνότητες των διαφορετικών γονοτύπων στους μάρτυρες και ασθενείς AEE φαίνονται στον πίνακα 3. Περίπου το 26% των ασθενών και το 13.8% των μαρτύρων φέρουν ένα συνδυασμό σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία των αλληλομόρφων με την μικρότερη συχνότητα για τα SNPs rs4769055 και rs3803277 (που εντοπίζονται στο ιντρόνιο 1 και 2 αντίστοιχα).

Χρησιμοποιώντας πολύπαραγοντική λογιστική παλίνδρομη ανάλυση συγκρίνοντας τους ασθενείς με τους υγιείς για τα διαφορετικά αλληλόμορφα του γονιδίου *ALOX5AP* φάνηκε ότι ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για το αλληλίο με την μικρότερη συχνότητα για τα δυο SNPs (rs4769055 και rs202068154) έχει μικρότερη πιθανότητα να ευθύνεται για την εμφάνιση AEE. Πιο συγκεκριμένα οι γονότυποι CA και AA για το rs4769055 θεωρούνται προστατευτικοί για την ανάπτυξη AEE, από την στιγμή που οι φορείς έδειξαν 45% και 91,5% αντίστοιχα μικρότερη πιθανότητα κινδύνου για AEE (OR:0.551, 95%CI:0.328-0.9253, p-value=0.024 and OR:0.085, 95%CI:0.046-0.158, p-value<0.001 αντίστοιχα). (πίνακας 2)

Για το rs202068154 η ύπαρξη C είτε σε ετεροζυγωτία είτε σε ομοζυγωτία (γονότυποι AC ή CC) έχει 85% μικρότερη πιθανότητα για ανάπτυξη AEE (OR:0.150, 95%CI:0.030-0.753, p-value=0.021) (Πίνακας 3)

Πίνακας 3: Οι μονονουκλεοτιδικές αλλαγές και η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων σε ασθενείς με ΑΕΕ και στους μάρτυρες

residue** ονομασία HGVS	Variation ID (dbSNP)	Εξόνιο/ ιντρόνιο	νουκλεοτίδιο (MAF: αλληλίο με την χαμηλότερη συχνότητα)	EX_SKIP	Human Splicing Finder (HSF)	γονότυπος/ MAF#	ΑΕΕ (n:213) Αριθμός (συχνότητα)	Μάρτυρες (n:210) Αριθμός (συχνότητα)	p-value*
c.70+18C/A g.31309830C>A	rs4769055	1	C/A(0.490)	Both alleles have a comparable chance of exon skipping.	SF2/ASF (IgMBRCA1) & SF2/ASF broken	CC CA AA	131(63.3%) 58(28%) 18(8.7%)	68(32.4%) 49(23.3%) 93(44.3%)	<0.001
p. S41S c.123C/T g.31318249C>T	rs41351946	2	C/T(0.005)	higher chance of exon skipping than wt allele	New silencer motif -19.58	CC CT TT	205(99.9%) 2(1%) 0(0.00%)	210(100%) 0(0.00%) 0(0.00%)	0.153
c.170+12C/A g.31318308C>A	rs3803277	2	C/A(0.473)	Both alleles have a comparable chance of exon skipping.	Rescue ESE hexamer created	CC CA AA	98(47.3%) 85(41.1%) 24(11.6%)	60(28.6%) 129(61.4%) 21(10%)	<0.001
c.170+44A/C g.31318340A>C	rs202068154	2	A/C(0.001)	Both alleles have a comparable chance of exon skipping.	sites created SF2/ASF (IgMBRCA1) & PESE octamers and silencer motif destroyed	AA AC CC	205(99.03%) 2(0.97%) 0(0.00%)	202(96.2%) 8(3.8%) 0(0.00%)	<0.058
						A	22.7%	57.3%	
						T	0.48%	0.00%	
						A	32.1%	40.7%	
						C	0.487%	1.95%	

**ALOX5AP αλληλουχία γονιδίου: NM_001629.3, ENSEMBL: ENST00000380490; αρίθμηση σύμφωνα με HGVS ονοματολογία-cDNA αλληλουχία με το +1 να αντιστοιχεί στην Α του κωδικονίου έναρξης μετάφρασης ATG.*p-values calculated by double-sided Fisher's exact test; # MAF: αλληλόμορφο με την μικρότερη συχνότητα- φαίνονται και οι συχνότητες στους ασθενείς με ΑΕΕ και στους μάρτυρες; EX_SKIP: <http://ex-skip.img.cas.cz/>, HSF: http://www.umd.be/HSF/4DACTION/input_SSF

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε πολυπαραγοντική πολυωνμική παλίνδρομη ανάλυση ρυθμισμένη για το φύλο, την ηλικία, στεφανιαία νόσο και κολπική μαρμαρυγή με σκοπό να ερευνηθεί όποια πιθανή συσχέτιση μεταξύ των αλληλομόρφων (SNPS) του γονιδίου *ALOX5AP* με τους λοιπούς υποτύπους ΑΕΕ όπως έχουν καθορισθεί με την κατάταξη TOAST (Adams και συνεργάτες 1993). Η ομάδα ασθενών με νόσο των μικρών αγγείων θεωρήθηκε ως ομάδα αναφοράς διότι περιείχε τον μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και έτσι συγκρίθηκε με τους άλλους τύπους ΑΕΕ (Πίνακας 4). Μόνο το rs3803277 βρέθηκε να έχει διαφορετικό κίνδυνο για τους υπότυπους ΑΕΕ. Πιο συγκεκριμένα οι μάρτυρες με ετεροζυγωτία (CA) ή ομοζυγωτία (AA) για το αλληλόμορφο με την μικρότερη συχνότητα (MAF) έχουν 66% και 82% αντίστοιχα μικρότερη πιθανότητα να αναπτύξουν ΑΕΕ από νόσο των μικρών αγγείων παρά από οποιαδήποτε άλλον υπότυπο ΑΕΕ (OR:0.337, 95% CI:0.178-0.638, p-value=0.001 and OR:0.179, 95%CI:0.059-0.537, p-value=0.022 αντίστοιχα).

Πίνακας 4: πολυπαραγοντική πολυωνμική παλίνδρομη ανάλυση υποτύπων ΑΕΕ με
διάφορετικά αλληλόμορφα του γονιδίου *ALOX5AP*

	Odds Ratio	95% Confidence Interval	P-value
Γένος			
Γυναίκες*	1		
Άνδρες	1.025	(0.532, 1.976)	0.940
Ηλικία(59)			
Ανά έτος	1.027	(1.004, 1.050)	0.022
ΣΝ			
ΟΧΙ*	1		
ΝΑΙ	0.398	(0.168, 0.948)	0.037
ΚΜ			
ΟΧΙ*			
ΝΑΙ	0.618	(0.227, 1.681)	0.346
rs3803277			
CC*			
CA	0.337	(0.178, 0.638)	0.001
AA	0.179	(0.059, 0.537)	0.002

* γονότυπος αναφοράς, ΣΝ: Στεφανιαία νόσος, ΚΜ: Κολπική Μαρμαρυγή

5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΥ ΓΕΟΝΩΜΙΚΟΥ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ (array CGH)

Από την ομάδα των συμπτωματικών εξωκράνιων στενώσεων/απόφραξη της καρωτίδας από τους συνολικά 8 ασθενείς βρέθηκε ένας άνδρας ασθενής που φέρει μοριακές διαταραχές στις χρωμοσωμικές περιοχές που περιέχουν τα γονίδια *TBX1* (22q11.21) & *COL4A1*, *COL4A2* (13q34) καθώς και μια γυναίκα με απόφραξη καρωτίδος με ποικιλομορφία αριθμού αντιγράφων (CNV) στην χρωμοσωμική περιοχή που περιέχει το γονίδιο *TBX1*(22q11.21).

Στην ομάδα των συμπτωματικών ενδοκράνιων στενώσεων από τους 4 ασθενείς βρέθηκαν 2 να φέρουν CNVs, ένας άνδρας και μια γυναίκα στην χρωμοσωμική περιοχή όπου περιλαμβάνεται το γονίδιο *TNXA*, *TNXB* (6p21.33).

Στους 4 ασθενείς με το αιμορραγικά ΑΕΕ οι 3 ασθενείς βρέθηκαν με CNVs που περιλαμβάνουν τα γονίδια *TNXA* και *TBX1* (Πίνακες 5 και 6).

5.2.1 *COL4A1* & *COL4A2* χρωμοσωμικές μοριακές διαταραχές (CNVs), 13q34

Η βασική μεμβράνη των κυττάρων είναι ένα εξιδικευμένο εξωκυττάριο δίκτυο που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την κυτταρική συμπεριφορά. Οι ίνες κολλαγόνου τύπου 4 είναι το κυριότερο συστατικό της βασικής μεμβράνης και κωδικοποιούνται από 3 ζεύγη γονιδίων (*COL4A1* έως *COL4A6*). Τα πρωτεϊνικά παράγωγα των *COL4A1* & *COL4A2* βρίσκονται στη βασική μεμβράνη των κυττάρων σχεδόν όλων των θηλαστικών. Ανεπάρκεια των ανωτέρω ινών έχει αρκετές συνέπειες όπως πχ: είναι το αίτιο αυξημένης εμβρυϊκής θνησιμότητας σε πειραματόζωα. (Agtmael και συνεργάτες, 2010).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Επιλεγμένοι ασθενείς χωρίς παράγοντες κινδύνου (μέθοδος array CGH), τα μπλε πλαίσια αντιστοιχούν σε CNVs (αναφέρονται τα σημαντικά γονίδια από αυτά που συμπεριλαμβάνονται στα CNVs)

ΚΑΡΩΤΙΔΕΣ	ΦΥΛΟ	22q11.21- (<i>TBX1</i>)	6p21.33 (<i>TNXA/TNXB</i>)	13q34 (<i>COL4A1</i> & <i>COL4A2</i>)
1 –στένωση καρωτίδος	A			
2-αποφραξη καρωτίδας	Γ			
3-αποφραξη καρωτίδας	A			
4 -στένωση καρωτίδος	A			
5-στένωση καρωτίδος	Γ			
6-αποφραξη καρωτίδας	A			
7 –στένωση καρωτίδος	Γ			
8 –στένωση καρωτίδος	Γ			
ΕΝΔΟΚΡΑΝΙΑ ΣΤΕΝΩΣΗ				
9-στένωση μέσης εγκεφαλικής	A			
10-στένωση μέσης εγκεφαλικής	Γ			
11-στένωση βασικής	A			
12-στένωση μέσης εγκεφαλικής	A			
ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΕΣ				
13-Βασικά γάγγλια	A			
14-Βασικά γάγγλια	A			
15-Λοβώδης	A			
16-Λοβώδης	A			

Πρόσφατα έχει περιγραφεί ότι μεταλλάξεις ή μοριακές διαταραχές στην περιοχή 13q34 όπου εντοπίζεται το γονίδιο *COL4A1* προκαλούν οικογενή πορεγκεφαλία, νόσο των μικρών αγγείων των ενηλίκων, αιμοραγικό ΑΕΕ, καθώς και ένα νέο σύνδρομο με την ονομασία HANAC (κληρονομική αγγειοπάθεια με νεφροπάθεια, ανευρύσματα και κράμπες)

Σε πειραματόζωα η ανεπάρκεια του *COL4A1* και του *COL4A2* καθώς και μεταλλάξεις στο *COL4A2* οδηγούν σε αιμορραγίες κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι αξίζει να σημειωθεί ο ρόλος του *COL4A1* και του *COL4A2* στα αγγεία. (Tom Van Agtmael και συνεργάτες 2010).

Στο αγγειακό τοίχωμα η βασική μεμβράνη χωρίζει τα λεία μυϊκά κύτταρα από το ενδοθήλιο. Το τελευταίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειοδιαστολή μέσω της παραγωγής αγγειοδιασταλτικών ουσιών όπως νιτρικό οξύ, προσταγλανδίνες I₂ και E₂ και τον υπερπολωμένο παράγοντα του ενδοθηλίου. Ως κλινικό αποτέλεσμα η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων επηρεάζει την αρτηριακή πίεση και ευοδώνει την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.

Σε μελέτες που έχουν διενεργηθεί σε πειραματόζωα έχει βρεθεί πως βλάβες - γενικότερα- στην βασική μεμβράνη καθώς και βλάβες στις ίνες κολλαγόνου τύπου 4 (ειδικότερα ελαττωματική εναπόθεση αυτών στην βασική μεμβράνη) επηρεάζουν την διατήρηση του τόνου του αγγειακού τοιχώματος, την λειτουργικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. (Tom Van Agtmael και συνεργάτες 2010)

Επίσης μετά από πειράματα σε ποντίκια υποστηρίζεται ότι η αυξημένη ενδοκυττάρια συσσώρευση του COL4A1 ή η μειωμένη εξωκυττάρια συγκέντρωση του COL4A1, ή και τα δύο, συνεισφέρουν στην εκδήλωση σποραδικών

ενδοκράνιων αιμορραγιών και εγκεφαλικών αρτηριακών διαταραχών. (Yi-Chinn Weng και συνεργάτες 2012). Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ως παθοφυσιολογικός μηχανισμός ότι σε τυχόν ενδοκυττάρια εναπόθεση δημιουργείται κυτταροτοξικό stress και σε εξωκυττάρια εναπόθεση, η επίδραση γίνεται με ποιο σύνθετους μηχανισμούς, επεμβαίνοντας στις λειτουργίες της βασικής μεμβράνης, με ως αποτέλεσμα την επιβάρυνση της λειτουργίας των αγγείων. (Poschl E και συνεργάτες 2004)

Επίσης έχει υποστηριχθεί ότι οι μεταλλάξεις στο COL4A1 επηρεάζουν πολλαπλά όργανα σε ανθρώπους μέσω γενικευμένης νόσου των μικρών αγγείων. (Gould DB και συνεργάτες 2006).

Επιπλέον υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξη εξωγενών παραγόντων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κλινική έκφραση των <νοσημάτων> εκ των μεταλλάξεων *COL4A1* & *COL4A2*. Για παράδειγμα, οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις, οι αθλητικές δραστηριότητες και οι χρήση αντιπηκτικών έχουν επισημανθεί ως επιβαρυντικοί παράγοντες όπου συνεισφέρουν ευκολότερα στην εκδήλωση εγκεφαλικής αιμορραγίας σε ανθρώπους με *COL4A1* & *COL4A2* μεταλλάξεις. (Debbie S Kuo και συνεργάτες 2012)

5.2.2 Χρωμοσωμικές μοριακές διαταραχές (CNVs) 22q11.2, *TBX1* γονίδιο

Είναι το κυριότερο γονίδιο που εμπλέκεται στο σύνδρομο μικρό-ελλείμματος 22q11.2 (DiGeorge) και χαρακτηρίζεται από διάφορες συγγενείς ανωμαλίες, όπως δομικές ανωμαλίες του εγκεφάλου, διαταραχές ανωτέρων γνωστικών λειτουργιών, αυξημένο κίνδυνο ψυχιατρικών νοσημάτων (κυρίως σχιζοφρένεια).

Έχει παρατηρηθεί η σημαντικότητα της επίδρασης του *TBX1* διαμέσου μεσολαβητών δρώντας στα αγγειακά εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα προάγοντας

όχι μόνο την ανάπτυξη του λεμφικού αγγειακού συστήματος αλλά και την νέο-αγγειογέννεση γενικότερα. Τέτοιοι μεσολαβητές είναι για παράδειγμα ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας 3 (*VEGFR3*) καθώς και ο *DLL4* (delta like ligand 4). Συγκεκριμένα, το γονίδιο *TBX1* υποστηρίζει την ανάπτυξη και την διατήρηση των λεμφικών αγγείων μέσω της ικανότητάς του να ενεργοποιεί απευθείας τον *VEGFR3*. (Sara Cioffi και συνεργάτες, 2014)

Πειράματα σε ποντίκια ανέδειξαν ότι η απώλεια λειτουργικότητας του *TBX1* προκαλεί γενικευμένα «ελαττώματα» στα αγγεία του εγκεφάλου, προάγοντας την υπερπλασία των αγγείων και την αύξηση της νέο-αγγειογέννεσης με αποτέλεσμα την γενικευμένη αποδιοργάνωση του αγγειακού δικτύου. Επίσης, παρατηρήθηκε μειωμένη αιμάτωση του εγκεφαλικού ιστού, λόγω της γενικευμένης αγγειακής δυσλειτουργίας, οδηγώντας σε εγκεφαλική υποξία. (Sara Cioffi και συνεργάτες, 2014)

Έχει προταθεί ότι η μειωμένη έκφραση του ενδοθηλιακού *TBX1* μπορεί να έχει επιπτώσεις στην ανάπτυξη ή την λειτουργία του εγκεφάλου μέσω της επίδρασης του γονιδίου σε μόρια ακόμη μη γνωστά τα οποία φυσικά δρουν στους νευρώνες. Τελευταία έχει περιγραφεί ότι το *TBX1* είναι ρυθμιστής της εγκεφαλικής νέο-αγγειογέννεσης. Επομένως, η απώλειά του, προκαλεί αρνητική ρύθμιση της νέο-αγγειογέννεσης διά μέσου του άξονα των *VEGFR3* και *DLL4*. Σε αυτό σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι σε πειραματόζωα η απενεργοποίηση του *VEGFR3* στα ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλεί αρκετά αυξημένη νέο-αγγειογέννεση μέσω ανάπτυξης νέων αγγειακών διακλαδώσεων καθώς και υπερπλασία των αγγείων στον αμφιβληστροειδή και στον ρομβοειδή εγκέφαλο (Tamella και συνεργάτες, 2011). Έτσι το γονίδιο *TBX1* συμπεριφέρεται ως ανώτερος ρυθμιστής μέσω

πολλαπλών μηχανισμών-ρυθμιστικών οδών, μερικοί από τους οποίους δεν είναι ακόμη γνωστοί. (Sara Cioffi και συνεργάτες, 2014)

Ως εκ τούτου η μειωμένη έκφραση του ενδοθηλιακού *TBX1* μπορεί να έχει ως αντίκτυπο στην γενικότερη μειωμένη ανάπτυξη ή λειτουργία του εγκεφάλου προκαλώντας γενικευμένη υπερπλασία των εγκεφαλικών αγγείων καθώς και λειτουργικά ελαττώματα των αγγείων που συνήθως οδηγούν σε εγκεφαλική υποξία. Οι εγκεφαλικές αγγειακές ανατομικές και λειτουργικές ανωμαλίες σε ασθενείς με μοριακές διαταραχές στο *TBX1* γονίδιο, ενδέχεται να αποτελούν το τελικό αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης διεργασίας που έλαβε χώρα σε μικροαγγειακό κυτταρικό επίπεδο (Sara Cioffi και συνεργάτες, 2014)

5.2.3 Χρωμοσωμικές διαταραχές (CNVs) 6p21.33, *TNXA* & *TNXB* γονίδια

Οι τενασκίνες είναι γλυκοπρωτείνες που ανευρίσκονται στον εξωκυττάριο δίκτυο πολλών ιστών. Ο ρόλος τους δεν είναι μόνο να υποστηρίζουν τον ιστό στον οποίο βρίσκονται αλλά και να ρυθμίζουν την μοίρα διαφορετικών τύπων κυττάρων που απαρτίζουν το δίκτυο. Η τενασκίνη-X (*TNXB*) είναι το μεγαλύτερο γνωστό μέλος της οικογένειας των τενασκινών. Η *TNXB* ανευρίσκεται στον μυϊκό ιστό (κυρίως στον καρδιακό μυ και στους σκελετικούς μύες) καθώς επίσης και γύρω από τα αγγεία και περιφερικά νεύρα.

Έχει βρεθεί μερική ή πλήρη ανεπάρκεια της *TNXB*, σε μια μορφή του συνδρόμου Ehlers-Danlos καθώς και στο σύνδρομο καλόηθων υπερκινητικών αρθρώσεων.

Το σύνδρομο Ehlers-Danlos είναι ο πιο γνωστός εκπρόσωπος των κληρονομικών νοσημάτων του συνδετικού ιστού. Μετά από πολλές ανακατατάξεις, διαχωρίζεται πια σε 6 υπότυπους, ανάλογα με την διαφορετικότητα των κλινικών

εκδηλώσεων, τις μορφές κληρονομικότητας, και τους γονιδιακούς τόπους. Όμως τρεις τύποι του συνδρόμου έχουν συγκεντρώσει την προσοχή τόσο ερευνητικά όσο και στην κλινική πρακτική: 1) κλασσικός τύπος 2) υπερκινητικός τύπος και 3) αγγειακός τύπος. Αξίζει να σημειωθεί η σοβαρότητα της κλινικής έκφρασης στην αγγειακή μορφή της νόσου ήτοι αρτηριακοί διαχωρισμοί, αορτικά και εγκεφαλικά ανευρύσματα (Beighton P και συνεργάτες 1969).

Εκ των τριών, ο υπερκινητικός τύπος είναι πιο συχνός κυμαινόμενος από 1/5000 έως 1/20000 γεννήσεις. Ερευνητές την τελευταία 10-ετία έχουν περιγράψει αυτό που πιστευόταν ότι ήταν η υπολειπόμενη μορφή του συνδρόμου Ehlers-Danlos-υπερκινητική μορφή, σε αντίθεση με την συνήθη αυτοσωματική επικρατητική κληρονομικότητα του Ehlers-Danlos-υπερκινητική μορφή. Σε αυτήν την μορφή οι ασθενείς μπορεί να έχουν μερική ή πλήρη ανεπάρκεια της *TNXB*, (Schalkwijk και συνεργάτες, 2001). Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και στο σύνδρομο καλόηθων υπερκινητικών αρθρώσεων. Η *TNXB* ρυθμίζει την δομή και την σταθερότητα των ελαστικών ινών εντός του εξωκυτταρικού δικτύου, ως εκ τούτου το γονίδιο *TNXB* μπορεί να εμπλέκεται για την εκδήλωση των συμπτωμάτων και στα δύο νοσήματα. Στην βιβλιογραφία υπάρχει σύγχυση και τελευταία αρκετοί ερευνητές το σύνδρομο των καλόηθων υπερκινητικών αρθρώσεων το κατατάσσουν ως μορφή της Ehlers-Danlos υπερκινητικής μορφής.(Petersen and Yellowlees, 2013).

Αναλύσεις του δέρματος ασθενών με ανεπάρκεια *TNXB* ανέδειξαν ότι οι ίνες ελαστίνης ήταν ανώριμες και περιείχαν λίγα ή και καθόλου μικροϊνίδια. (Zweers και συνεργάτες, 2004). Η *TNXB* έχει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της δομής και της σταθερότητας των ελαστικών ινών εντός του εξωκυττάριου δικτύου (Bornstein και συνεργάτες, 2002). Επομένως, η ανεπάρκεια ή βαθμός μερικής έλλειψης της

TNXB είναι ανάλογος με την έκταση των κλινικών εκδηλώσεων της Ehlers-Danlos υπερκινητικής μορφής αφορώντας κυρίως τον κερατοειδή, το έντερο, τους πνεύμονες και τα αγγεία. (Petersen and Yellowlees, 2013).

Επίσης έχει βρεθεί ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση της TNXB σε ασθενείς με ανευρύσματα της θωρακικής και της κοιλιακής αορτής το πιθανότερο στα πλαίσια νέο-αγγειογένεσης του ανευρυσματικού αρτηριακού τοιχώματος. (Kazumi και συνεργάτες, 2010). Σε συνέχεια του ανωτέρω, έχει αποδειχθεί σε πειραματόζωα ο σημαντικός ρόλος που κατέχει η TNXB στην νέο-αγγειογένεση μέσω της αλληλεπίδρασης με τον ενδοθηλιακό παράγοντα β (*VEGF-B*), διεγείροντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ως εκ τούτου, οι ερευνητές κατέληξαν ότι η TNXB είναι ένα συστατικό του εξωκυτταρικού δικτύου όπου ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και την ανάπτυξη νέων αγγείων. (Tomoki Ikuta και συνεργάτες, 2000)

Επιπλέον, συνολικά το κολαγόνο η ελαστίνη και το εξωκυττάριο δίκτυο απαρτίζουν την βάση για το υπο-ενδοθήλιο το οποίο προσδίνει δυναμική και ελαστικότητα σε όλα τα αγγεία. Ως εκ τούτου, τα αγγεία ασθενών με ανεπάρκεια TNXB τείνουν προς την υποτονικότητα παρά προς την ελαστικότητα. (Petersen and Yellowlees, 2013). Το ανωτέρω μπορεί να υποστηριχθεί περισσότερο από το γεγονός ότι σε ασθενείς με σύνδρομο καλόθων υπερκινητικών αρθρώσεων παρατηρήθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ορθοστατική υπόταση ή ορθοστατική ταχυκαρδία (Rowe και συνεργάτες, 1999, Gazit και συνεργάτες, 2003). Επίσης σε σειρές ασθενών με Ehlers-Danlos-υπερκινητική μορφή με συνοδό ανεπάρκεια TNXB, στα συνυπάρχοντα νοσήματα έχει περιγραφεί και η πρόιμη αθηροσκλήρωση. Δεν ήταν όμως δυνατόν να αποσαφηνιστεί, εάν τα συνυπάρχοντα νοσήματα - συμπεριλαμβανομένου και της πρόιμης αθηροσκλήρωσης- οφείλονταν

στην ανεπάρκεια TNXB ή ήταν τυχαίες συνυπάρχουσες διαταραχές (Schalkwijk και συνεργάτες, 2001)

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

I. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *ALOX5AP*

Η πολυπαραγοντική αιτιολογία του ΑΕΕ δεν είναι ευρέως κατανοητή και όσο αφορά στην παθογένεση του ΑΕΕ, το πιθανότερο είναι να οφείλεται στον συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών επιβαρυντικών παραγόντων παρά σε πολυμορφισμούς που μπορεί να επηρεάζουν την εκδήλωση του. Είναι πιθανόν, η συνολική αλληλεπίδραση πολυμορφισμών συγκεκριμένων απλοτύπων να διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο για την ανάπτυξη ΑΕΕ παρά ένας μόνος πολυμορφισμός. (Zintzaras και συνεργάτες 2009).

Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στην πρόληψη και την θεραπεία των νοσημάτων, το ΑΕΕ παραμένει η 3^η αιτία θανάτου παγκοσμίως και είναι το πρώτο αίτιο αναπηρίας είτε σωματικής είτε νοητικής. Ο γονιδιακός έλεγχος ασθενών που υπέστησαν ΑΕΕ είναι μια υποσχόμενη προσέγγιση ώστε να ταυτοποιηθούν οι βιολογικοί μηχανισμοί που συνεισφέρουν στην εκδήλωση του, με τελικό στόχο, να μπορέσουν να καθορισθούν προληπτικές στρατηγικές καθώς και θεραπείες οξείας φάσης. Συγκεκριμένα για την πρόληψη, η εύρεση σπανίων SNPs καθώς και η ανάλυση αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος μπορεί να αποφέρουν σημαντικό όφελος στην περαιτέρω κατανόηση και πρόληψη του ΑΕΕ. (Falcone Guido και συνεργάτες, 2014)

Έχει παρατηρηθεί ότι ενώ κάποιοι άνθρωποι έχουν αποδεδειγμένα μια συγκεκριμένη μετάλλαξη/γονότυπο που προκαλεί συγκεκριμένη νόσο, παραδόξως η νόσος αυτή δεν αναπτύσσεται, τουλάχιστον στο 100%. Το ανωτέρω φαινόμενο είναι γνωστό ως <μειωμένη διεισδυτικότητα> και δεν είναι σπάνιο. Πράγματι υπάρχουν πολλά παραδείγματα ανθρώπων που φέρουν <μεταλλάξεις που

προκαλούν νοσήματα> τα οποία τελικά, αποτυγχάνουν να προκαλέσουν την νόσο τουλάχιστον σε ένα ποσοστό των φορέων. Επομένως, το ανωτέρω γεγονός μπορεί να εξηγήσει πώς γενετικές νόσοι, κάποιες φορές, μπορεί να μεταφερθούν μέσω γονέων που δεν πάσχουν, καθώς επίσης, ότι υγιείς άνθρωποι μπορεί να έχουν αρκετά SNPs χωρίς να παρουσιάζουν σημάδια νόσου (Cooper David και συνεργάτες, 2013).

Η <μειωμένη διεισδυτικότητα> μπορεί να είναι λειτουργία συγκεκριμένης μετάλλαξης ή μπορεί να αντικατροπτίζει την <ποσότητα> του αλληλίου ή το αποτέλεσμα έκφρασης διάφορων αλληλίων μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των. Η διεισδυτικότητα κάποιων παθογενών γονοτύπων είναι γνωστό ότι μπορεί να εξαρτάται από την ηλικία ή/και το φύλο, όπως επίσης μπορεί να απεικονίζει την δράση μη συσχετισμένων τροποποιητικών γονιδίων, επιγενετικών αλλαγών ή περιβαλλοντικών παραγόντων. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ύπαρξη πλήρους διεισδυτικότητας απαιτεί την παρουσία ενός ή περισσότερων γενετικών SNPs σε διαφορετικές θέσεις (Cooper David και συνεργάτες, 2013).

Ενώ μεταλλάξεις με αυξημένη διεισδυτικότητα, μπορούν να ασκούν την δράση τους με σχετικά μικρή αλληλεπίδραση με άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, τουναντίον, οι μεταλλάξεις με χαμηλή διεισδυτικότητα χαρακτηρίζονται από σημαντικές αλληλεπιδράσεις των γονιδίων μεταξύ των, ή/και των γονιδίων με το περιβάλλον. Διαφορετικοί συνδυασμοί τέτοιων SNPs μπορεί να συνεισφέρουν στην διαφορετικότητα των χαρακτηριστικών διεισδυτικότητας, όχι μόνο μονογονιδιακών αλλά και πιο σύνθετων νοσημάτων.

Όταν υφίσταται μετάλλαξη μειωμένης διεισδυτικότητας, οποιασδήποτε μοριακής βάσης, είναι αρκετά πιθανό να αποτελεί εμπόδιο εκτέλεσης οποιουδήποτε

σχεδίου που έχει ως σκοπό την ιεράρχηση της δυναμικής των SNPs, ήτοι της δυναμικής των μονονουκλεοτιδικών αλλαγών. Όμως, παρά την πολυπλοκότητα ανάλυσης/πρόγνωσης του τελικού κλινικού φαινοτύπου που μπορεί να χαρακτηρίζει τα SNPs μειωμένης διεισδυτικότητας, παράλληλα, αναγεννάται η ελπίδα ότι εάν γίνει εφικτό να ταυτοποιηθούν οι παράγοντες (πχ: περιβαλλοντικοί, φαρμακευτικοί) που μπορούν να συνεισφέρουν στην μείωση της διεισδυτικότητας των SNPs ή αλλιώς να καθυστερήσουν την έναρξη του καταρράκτη των παθολογικών διεργασιών, τότε ανοίγει ο δρόμος για τη χρήση νέων πολλά υποσχόμενων θεραπειών (Cooper David και συνεργάτες, 2013).

Φαινότυποι σύνθετων / πολυπαραγοντικών νοσημάτων όπως το ΑΕΕ, μπορούν να εξηγηθούν από την υπόθεση “συχνή νόσος, κοινές SNPs”, όπου οι επιδράσεις αριθμού συνηθισμένων SNPs, η καθεμία με μικρό μέγεθος επίδρασης και σχετικά χαμηλής διεισδυτικότητας, να προκαλεί νόσο, ή την υπόθεση “συχνή νόσος, σπάνιες SNPS” όπου σύνθετοι φαινότυποι προκύπτουν από πολλαπλές σπάνιες SNPS, όμως η κάθε SNP να παρουσιάζει αυξημένη διεισδυτικότητα και μεγάλα μεγέθη (Schork και συνεργάτες, 2009). Είναι αρκετά πιθανό ότι αλληλία (είτε κοινά είτε σπάνια) συνεισφέρουν στην εμφάνιση σύνθετων φαινότυπων, όπου σπάνια SNPs έχουν αυξημένες επιδράσεις στον φαινότυπο, συμπληρούμενες από μεγάλο αριθμό συχνών SNPs με μικρές επιδράσεις.

Οι κλινικοί φαινότυποι των σύνθετων νοσημάτων μπορεί να υφίστανται λόγω της αλληλεπίδρασης πολλαπλών αιτιολογικών αλληλίων ή να οφείλονται σε μη γενετικούς παράγοντες (Cooper και συνεργάτες, 2013). Το ΑΕΕ ως μια πολυπαραγοντική / σύνθετη διαταραχή, για την κλινική του εκδήλωση, έχει αποδειχθεί ότι είναι αναγκαία η ύπαρξη αυξημένου ρίσκου αλληλίων σε πολλά γονίδια και/ή περιβαλλοντικοί παράγοντες. (Traylor και συνεργάτες, 2012).

Οι SNPs μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση πολυπαραγοντικών διαταραχών. Στην παρούσα μελέτη έγινε αλληλούχιση κωδικοποιούσων περιοχών του γονιδίου *ALOX5AP*, όμως, η υπόθεση των πολλαπλών αιτιολογικών SNPs ή των SNPs που συνεισφέρουν στην τελική μορφή του κλινικού φαινότυπου κάποιας νόσου, δεν αποδείχθηκε. Τουναντίον βρήκαμε ότι οι SNPs rs3803277 και rs202068154 προσφέρουν προστατευτικό ρόλο, ενώ το SNPs rs3803277 είναι προστατευτικό για ΑΕΕ των μικρών αγγείων. Πιθανότατα οι ανωτέρω SNPs να μειώνουν την παραγωγή λειτουργικής ALOX5AP πρωτεΐνης και κατ'αυτόν τον τρόπο, να ασκούν προστατευτική δράση για την μη ανάπτυξη ΑΕΕ.

Η πρώτη μελέτη από τους Helgadóttir και συνεργάτες (2004) ανέφερε την κατά ποσοστό 1,67 αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης ΑΕΕ σε φορείς του απλότυπου A που αφορούσε Ισλανδούς ασθενείς. Συγκεκριμένα ο απλότυπος A καθορίζεται από 4 SNPs (SG13S25, SG13S114-rs 10507391, SG13S89-rs4769874 και SG13S32) στα πρώτα 4 εξόνια, βρίσκοντας συσχέτιση με ΑΕΕ και έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με ΑΕΕ δεν είχαν χωρισθεί σε κατηγορίες ανάλογα τον υπότυπο ΑΕΕ που είχαν εμφανίσει συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς και με αιμορραγικό ΑΕΕ.

Το 2005 ακολούθησε νέα μελέτη από τους Helgadóttir και συνεργάτες σε διαφορετικό πληθυσμό (Σκωτία-Aberdeenshire) όπου συντάχθηκε με τα ευρήματα της πρώτης μελέτης. Αργότερα ακολούθησαν πολλές μελέτες όπου τα ευρήματα σε κάποιες ήταν θετικά και σε άλλες ήταν αρνητικά για την συσχέτιση του ALOX5AP για την αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης ΑΕΕ. Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκε η θεωρία ότι η διαφορετικότητα των αποτελεσμάτων πιθανόν να οφείλεται στην διαφορετικότητα των φυλών των μελετών ή/και μπορεί να υπάρχουν και άλλες SNPs όπου σε συνδυασμό με τις προαναφερόμενες SNPs, να αυξάνουν την

προδιάθεση για ανάπτυξη AEE (Zintzaras και συνεργάτες 2009). Επίσης είναι σημαντικό ότι σε καμία από τις προηγούμενες μελέτες δεν έγινε αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδίου όπως επίσης οι SNPs που αναφέρονται στην παρούσα μελέτη, δεν έχουν αναφερθεί στις προηγούμενες μελέτες.

Οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να επιδρούν σε διάφορα επίπεδα και να συμβάλλουν μαζί με γνωστούς παράγοντες κινδύνου που έχουν γενετική συνιστώσα (πχ: υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, επίπεδα ομοκυστεΐνης). Μπορεί να αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες ή να συμβάλλουν άμεσα στον ενδιάμεσο φαινότυπο, όπως η αθηροσκλήρωση. Επιπροσθέτως, έχει περιγραφεί ότι γενετικοί παράγοντες μπορεί να καθυστερήσουν την εμφάνιση AEE, το μέγεθος του ισχαιμικού εμφράκτου ή την αποκατάσταση μετά από AEE. (Dichgans και συνεργάτες 2007).

Η πολυπαραγοντική αιτιολογία του AEE δεν είναι ευρέως κατανοητή και όσο αφορά την παθογένεση το πιθανότερο είναι να οφείλεται στον συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών επιβαρυντικών παραγόντων παρά σε έναν πολυμορφισμό που μπορεί να επηρεάζει την εκδήλωση AEE. Επομένως, είναι πιθανό, η συνολική αλληλεπίδραση πολυμορφισμών συγκεκριμένων απλοτύπων να διαδραματίζει κύριο ρόλο για την ανάπτυξη AEE (παρά ένας μόνο πολυμορφισμός). Το ίδιο λοιπόν, μπορεί να συμβαίνει στην ύπαρξη προστατευτικών πολυμορφισμών για την μη ανάπτυξη AEE. Ως εκ τούτου, η κλινική έκφραση αυτών των SNPs, ήτοι η προστασία για την μη ανάπτυξη AEE, μπορεί να καθορίζεται από την δυναμική των SNPs, την ύπαρξη μεγάλης ή μικρής διευσδυτικότητας, καθώς και τυχόν αλληλεπιδράσεις με περιβαντολλογικούς παράγοντες. Επίσης, περαιτέρω μελέτη τέτοιων <προστατευτικών SNPs> και κατ' επέκταση των πρωτεϊνικών προϊόντων τους, μπορεί να ανοίξει τον δρόμο προς την

δημιουργία νέων θεραπειών που θα έχουν ως σκοπό την ενίσχυση της διεισδυτικότητας τους.

II. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *COL4A1*, *COL4A*, *TNXB*, *TBX1*

Το ΑΕΕ είναι ως γνωστόν πολυπαραγοντικό νόσημα. Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην εκδήλωση του μπορεί να είναι μη τροποποιήσιμοι (φύλο, ηλικία, κληρονομικότητα, φυλή) και τροποποιήσιμοι (κάπνισμα, υπερλιπιδαιμία, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, κατάχρηση οινόπνευματος, διαταραχές πηκτικότητας, χρήση τοξικών ουσιών κτλ). Επίσης, υπάρχουν πολλές εργασίες στην βιβλιογραφία που συχνά προσπαθούν να συσχετίσουν γενετικούς πολυμορφισμούς ή μεταλλάξεις με την εκδήλωση ΑΕΕ ή τον προστατευτικό ρόλο αυτών για την πιθανή μη εκδήλωση ΑΕΕ καθώς επίσης και η διαφορετική έκφρασή τους όταν οι ασθενείς με ΑΕΕ έχουν ιστορικό τροποποιήσιμων ή μη τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου. (Lampe και συνεργάτες, 2004).

Λαμβάνοντας τα ανωτέρω υπ' όψιν, επιλέξαμε η ομάδα των ασθενών να έχει υποστεί ΑΕΕ από αθηρωματική νόσο των μεγάλων εξωκράνιων ή ενδοκράνιων αγγείων καθώς επίσης να έχουν ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό από γνωστούς τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου. Ουσιαστικά πρόκειται για ασθενείς που υπέστησαν ΑΕΕ λόγω στένωσης ή απόφραξης έξω- ή ενδοκράνιων αγγείων χωρίς επιβαρυνμένο ατομικό αναμνηστικό. Οι ασθενείς με αιμορραγία συμπεριλήφθηκαν ως μια διαφορετική ομάδα με διαφορετικού τύπου ΑΕΕ.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι τα γονίδια *COL4A1*, *COL4A2* και *TBX1* βρέθηκαν σε ασθενείς με εξωκράνια συμπτωματική στένωση ή απόφραξη των καρωτίδων. Το γονίδιο *TNXB* βρέθηκε σε ασθενείς με

συμπτωματική στένωση των ενδοκράνιων αγγείων ενώ μοριακές διαταραχές στα γονίδια *TNXB* και *TBX1* βρέθηκαν ταυτόχρονα σε ασθενείς με αιμορραγικό ΑΕΕ.

Σίγουρα η εξήγηση των αποτελεσμάτων είναι δύσκολη, και μπορεί κάποιος να σκεφθεί ότι τα παραπάνω, μπορεί να αποτελούν τυχαίο εύρημα και ουδεμία σχέση μπορεί να έχουν με τον τύπο του ΑΕΕ που εμφάνισαν οι ασθενείς ή τουλάχιστον με όλους τους τύπους ΑΕΕ των ασθενών.

Σχετικά με τα γονίδια *COL4A1* & *COL4A2*, σε μελέτες που έχουν διενεργηθεί σε πειραματόζωα έχει βρεθεί πως βλάβες -γενικότερα- στην βασική μεμβράνη καθώς και βλάβες στις ίνες κολλαγόνου τύπου 4 (ειδικότερα ελαττωματική εναπόθεση αυτών στην βασική μεμβράνη) επηρεάζουν την διατήρηση του τόνου του αγγειακού τοιχώματος, την λειτουργικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, προάγοντας έτσι την αθηροσκλήρωση (Van Agtmael και συνεργάτες, 2010). Σημειώνεται ότι, οι ίνες κολλαγόνου τύπου 4 είναι το κυριότερο συστατικό της βασικής μεμβράνης και κωδικοποιούνται από 3 ζεύγη γονιδίων, *COL4A1* έως *COL4A6*. (Van Agtmael και συνεργάτες, 2010).

Επίσης, μετά από πειράματα σε ποντίκια υποστηρίζεται ότι η αυξημένη ενδοκυττάρια συσσώρευση του *COL4A1* ή η μειωμένη εξωκυττάρια συγκέντρωση του *COL4A1*, ή και τα δύο, συνεισφέρουν στην εκδήλωση σποραδικών ενδοκράνιων αιμορραγιών και εγκεφαλικών αρτηριακών διαταραχών. (Weng και συνεργάτες, 2012). Ως εκ τούτου τα γονίδια *COL4A1* & *COL4A2* μπορεί να είναι επιβαρυντικός παράγοντας για αθηροσκλήρωση αλλά και για ενδοκράνια αιμορραγία με άγνωστο μηχανισμό πότε θα προκαλέσει το ένα και πότε θα προκαλέσει το άλλο.

Σχετικά με το γονίδιο *TBX1*, έχει παρατηρηθεί η σημαντικότητα της επίδρασης του *TBX1* διαμέσου μεσολαβητών δρώντας στα αγγειακά εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα προάγοντας όχι μόνο την ανάπτυξη του λεμφικού αγγειακού συστήματος αλλά και την νέο-αγγειογέννεση γενικότερα. (Cioffi και συνεργάτες, 2014). Ως εκ τούτου η μειωμένη έκφραση του ενδοθηλιακού *TBX1* μπορεί να έχει ως αντίκτυπο στην γενικότερη μειωμένη ανάπτυξη ή λειτουργία του εγκεφάλου προκαλώντας γενικευμένη υπερπλασία των εγκεφαλικών αγγείων καθώς και λειτουργικά ελαττώματα των αγγείων που συνήθως οδηγούν σε εγκεφαλική υποξία. Οι εγκεφαλικές αγγειακές ανατομικές και λειτουργικές ανωμαλίες σε ασθενείς με *TBX1* μοριακές διαταραχές, ενδέχεται να αποτελούν το τελικό αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης διεργασίας που έλαβε χώρα σε μικροαγγειακό κυτταρικό επίπεδο (Cioffi και συνεργάτες, 2014)

Το γονίδιο *TNXB* έχει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της δομής και της σταθερότητας των ελαστικών ινών εντός του εξωκυττάριου δικτύου (Bornstein και συνεργάτες, 2002.). Επομένως, η ανεπάρκεια ή βαθμός μερικής έλλειψης της *TNXB* είναι ανάλογος με την έκταση των κλινικών εκδηλώσεων της Ehlers-Danlos υπερκινητικής μορφής αφορώντας κυρίως τον κερατοειδή, το έντερο, τους πνεύμονες και τα αγγεία. (Petersen and Yellowlees, 2013). Αξίζει να σημειωθεί η σοβαρότητα της κλινικής έκφρασης στην αγγειακή μορφή της νόσου ήτοι αρτηριακοί διαχωρισμοί, αορτικά και εγκεφαλικά ανευρύσματα (Beighton και συνεργάτες 1969). Η *TNXB* είναι ένα συστατικό του εξωκυτταρικού δικτύου που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και την ανάπτυξη νέων αγγείων. (Tomoki Ikuta και συνεργάτες, 2001). Επιπλέον, συνολικά το κολαγόνο η ελαστίνη και το εξωκυττάριο δίκτυο απαρτίζουν την βάση για το υπο-ενδοθήλιο το οποίο προσδίνει δυναμική και ελαστικότητα σε όλα τα αγγεία. Ως

εκ τούτου, τα αγγεία ασθενών με ανεπάρκεια TNXB τείνουν προς την υποτονικότητα παρά προς την ελαστικότητα. (Petersen και Yellowlees, 2013). Ως εκ τούτου, όλα τα ανωτέρω, επηρεάζουν την διατήρηση του τόνου του αγγειακού τοιχώματος, την λειτουργικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, προάγοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την αθηροσκλήρωση.

Λαμβάνουν χώρα αρκετές διεργασίες σε μικροαγγειακό κυτταρικό επίπεδο (άλλες προστατευτικές και άλλες εις βάρος του αγγειακού τοιχώματος-ενδοθηλίου) διαμέσου μηχανισμών που δεν είναι ακόμη όλοι γνωστοί, όπως και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των. Μπορεί λοιπόν η στένωση ή η απόφραξη του αγγείου που οδηγεί σε ισχαιμικό ΑΕΕ, καθώς και η ρήξη του αγγείου που οδηγεί σε αιμορραγικό ΑΕΕ να έχουν κοινό αρχικό παθοφυσιολογικό μηχανισμό και η μετέπειτα τελική βλάβη του αγγείου (στένωση ή ρήξη) να καθορίζεται και από άλλους παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι τροποποιήσιμοι εξωγενείς ή μη τροποποιήσιμοι, πολυπαραγοντικοί γενετικοί, διότι ως γνωστόν το ΑΕΕ είναι πολυπαραγοντικό νόσημα. Στην δυσλειτουργία του ενδοθηλίου εάν συμπεριλάβουμε και την διαφορετική γονιδιακή έκφραση σε τυχόν συνύπαρξη άλλων παραγόντων κινδύνου, τότε καταλαβαίνουμε τις πολύπλοκες και σύνθετες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα έως την τελική εκδήλωση ισχαιμικού ή αιμορραγικού ΑΕΕ. Για παράδειγμα, μελέτες ανέδειξαν την διαφορετικότητα έκφρασης του mRNA στα λευκά αιμοσφαίρια σε καπνιστές σε σύγκριση με μη καπνιστές, καταλήγοντας, ότι από την στιγμή που η έκθεση στον καπνό έχει τέτοια αποτελέσματα, τυχόν έκθεση, σε άλλους παράγοντες μπορεί να έχει διαφορετική γονιδιακή υπογραφή (Lampe και συνεργάτες, 2004)

Περαιτέρω προσπάθειες χρειάζονται για να γίνει κατανοητό ποιες ίνες του κολλαγόνου προάγουν το ενδοκυττάριο stress ή/και επηρεάζουν τα σήματα μεταξύ των υποδοχέων των κυτταρικών μεμβρανών ή διαταράσσουν τις ενδο- ή εξωκυττάρειες επικοινωνίες. Τα συμπεράσματα των ανωτέρω, θα συντελέσουν στην ανακάλυψη προγνωστικών εργαλείων καθώς και στην ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών για διάφορα νοσήματα. Φαίνεται ότι, όσο διαφορετικές και πολύπλοκες διεργασίες λαμβάνουν χώρα με διαφορετική κάθε φορά κατάληξη (ισχαιμικό ΑΕΕ ή αιμορραγικό ΑΕΕ) τόσο φαίνεται να υπάρχει ένας αρχικός κοινός παρονομαστής: οι αλληλεπιδράσεις του εξωκυτταρικού δικτύου με το ενδοθήλιο των εγκεφαλικών αγγείων.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- *Ελέγχθηκε το ALOX5AP ως παράγοντας φλεγμονής/αθηροσκλήρωσης. Βρέθηκαν SNPs, τα οποία μπορεί να επηρεάζουν το σωστό μάτισμα των εξονίων 1 και 2 και κατ'αυτόν τον τρόπο να τροποποιούν την παραγωγή λειτουργικής ALOX5AP πρωτεΐνης, ασκώντας προστατευτικό ρόλο στην μη ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης - ΑΕΕ.*
- *Βρέθηκαν CNVs τα οποία περιλαμβάνουν συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία ως κοινό παρανομαστή έχουν τις επιδράσεις τους στο ενδοθήλιο των αγγείων, και πιθανόν, να έχουν καταλυτική δράση στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης ή ρήξης των εγκεφαλικών αρτηριών, με τελικό αποτέλεσμα την εκδήλωση ισχαιμικού ή αιμορραγικού ΑΕΕ.*

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams HP Jr, Adams RJ, Brott T, del Zoppo GJ, Furlan A, Goldstein LB, Grubb RL, Higashida R, Kidwell C, Kwiatkowski TG, Marler JR, Hademenos GJ; Stroke Council of the American Stroke Association (2003). Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: A scientific statement from the Stroke Council of the American Stroke Association. *Stroke* **34**:1056-1083
- Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* **24**: 35-41
- Ay H, Koroshetz WJ, Benner T, Vangel MG, Wu O, Schwamm LH, Sorensen. Transient ischemic attack with infarction: a unique syndrome? *Ann Neurol*. 2005;57(5):679.
- Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med* 1992;326:733-6.
- Broderick J, Connolly S, Feldmann E, Hanley D, Kase C, Kieger D, Mayberg M, Morgenstern L, Ogilvy CS, Vespa P, Zuccarello M, American Heart Association, American Stroke Association Stroke Council, High Blood Pressure Research Council, Quality of care and outcomes in research interdisciplinary working group. *Stroke*.2007;38(6):2001
- Brass LM, Isaacsohn JL, Merikangas KR. A study of twins and stroke. *Stroke*. Feb 1992;23(20):221-3.
- Brass LM, Page WF, Lichtman JH. Stroke in twins III: a follow-up study. *Stroke*. 1998;29(Suppl):256.
- Bederson JB, Connolly ES Jr, Batjer HH, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke* 2009;40:994-1025.

- Broderick JP, Phillips SJ, Whisnant JP, O'Fallon WM, Bergstralh EJ. Incidence rates of stroke in the eighties: the end of the decline in stroke? *Stroke* 1989;20:577-82.
- Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med* 1992;326(11):733-6.
- Benditt EP (1976). Implications of the monoclonal character of human atherosclerotic plaques. *Beitr Pathol.* **158**:405-416.
- Beighton P, Price A, Lord J, Dickson E. Variants of the Ehlers–Danlos syndrome: clinical, biochemical, haematological and chromosomal features of 100 patients. *Ann Rheum Dis* 1969;28:228–45.
- Buja LM (1996). Does atherosclerosis have an infectious etiology? *Circulation* **94**: 872-873.
- Bova IY, Bornstein NM, Korczyn AD. Acute infection as a risk factor for ischemic stroke. *Stroke*. Dec 1996;27(12):2204-6.
- Burke, J.A., Levi, R., Guo, Z.G. & Corey, E.J. Leukotrienes C4, D4 and E4: effects on human and guinea-pig cardiac preparations in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **221**, 235–241 (1982).
- Boekholdt SM, Agema WR, Peters RJ, Zwinderman AH, van der Wall EE, Reitsma PH, et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation*. May 20 2003;107(19):2416-21.
- Bondarenko EA, Slominskii PA, Limborskaia SA, Shetova IM, Timofeev DY, Skvortsova VI. Polymorphic variants of ALOX5AP gene and the risk of acute stroke development in the Russian population. *Genetika* 2011; 47: 570-573.
- Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Oct;14(5):608-16.
- Cipollone F, Toniato E, Martinotti S. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA*. May 12 2004;291(18):2221-8
- Cerebrovasc Dis* **10** (Suppl. 3): 22-33.

- Carmelli D, DeCarli C, Swan GE, et al. Evidence for genetic variance in white matter hyperintensity volume in normal elderly male twins. *Stroke* Jun 1998;29(6):1177-81.
- Caplan LR (2000a). Basic Pathology, Anatomy, and Pathophysiology of Stroke.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Leza JC, Moro MA, Lizasoain I. Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke*. Apr 2008;39(4):1314-20.
- Cioffi S, Martucciello S, Fulcoli FG, Bilio M, Ferrentino R, Nusco , Illingworth E. Tbx1 regulates brain vascularization. *Hum Mol Genet*. 2014;23(1):78-89.
- Dichgans Martin. Genetic of the ischaemic stroke, *Lancet* volume 6 February 2007 Review.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* **337**:408-416.
- Davis MM, Taubert K, Benin AL, Brown DW, Mensah GA, Baddour LM. Influenza vaccination as secondary prevention for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association/American College of Cardiology. *Circulation*. Oct 3 2006;114(14):1549-53..
- Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK (1990) Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 343:282–284.
- Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol*. Feb 2007;6(2):149-61.
- Dwyer, J.H. *et al.* Arachidonate 5-Lipoxygenase Promoter Genotype, Dietary Arachidonic Acid, and Atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **350**, 29–37 (2004).
- Dahinden, C.A., Clancy, R.M., Gross, M., Chiller, J.M. & Hugli, T.E. Leukotriene C4 production by murine mast cells: evidence of a role for extracellular leukotriene A4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6632–6636 (1985).
- De Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(12):1365.
- Domingues-Montanari S, Fernández-Cadenas I, del Río-Espinola A, Corbeto N, Krug T, Manso H, et al. Association of a genetic variant in the ALOX5AP with higher risk of ischemic

- stroke: A case-control, meta-analysis and functional study. *Cerebrovascular Dis* 2010; 29: 528-537.
- Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. Jan 1 2004;350(1):29-37.
- Dichgans Martin. Genetic of the ischaemic stroke, *Lancet* volume 6 February 2007 Review
- Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, Hatsukami TS, Higashida RT, Johnston SC, Kidwell CS, Lutsep HL, Miller E, Sacco RL, American Heart Association, American Stroke Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, Council on Cardiovascular Nursing, Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke*. 2009;40(6):2276.
- Elkind MS, Cheng J, Boden-Albala B, et al. Elevated white blood cell count and carotid plaque thickness: the northern manhattan stroke study. *Stroke*. Apr 2001;32(4):842-9.
- Elkind MS, Sciacca RR, Boden-Albala B. Relative elevation in baseline leukocyte count predicts first cerebral infarction. *Neurology*. Jun 28 2005;64(12):2121-5.
- Elkind MS, Tai W, Coates K, Paik MC, Sacco RL. High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A2, and outcome after ischemic stroke. *Arch Intern Med*. Oct 23 2006;166(19):2073-80.
- Elkind MS, Cheng J, Boden-Albala B, Paik MC, Sacco RL (2001) Elevated white blood cell count and carotid plaque thickness: the northern manhattan stroke study. *Stroke* 32:842–849.
- Emsley HC, Hopkins SJ. Acute ischaemic stroke and infection: recent and emerging concepts. *Lancet Neurol*. Apr 2008;7(4):341-53.

- Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albala B. Leukocyte count is associated with aortic arch plaque thickness. *Stroke*. Nov 2002;33(11):2587-92.
- Elkind MS, Cheng J, Boden-Albala B, et al. Elevated white blood cell count and carotid plaque thickness: the northern manhattan stroke study. *Stroke*. Apr 2001;32(4):842-9
- Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albala B. Leukocyte count is associated with aortic arch plaque thickness. *Stroke*. Nov 2002;33(11):2587-92.
- Funk C.D (2005). Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 664-672.
- Fiore, S. & Serhan, C.N. Formation of lipoxins and leukotrienes during receptor-mediated interactions of human platelets and recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-primed neutrophils. *J. Exp. Med.* **172**, 1451–1457 (1990).
- Ford-Hutchinson, A.W. Leukotriene B4 in inflammation. *Crit. Rev. Immunol.* **10**, 1–12 (1990).
- Furlan AJ, Whisnant JP, Elveback LR. The decreasing incidence of primary intracerebral hemorrhage: a population study. *Ann Neurol* 1979;5:367-73.
- Flaherty ML, Kissela B, Woo D, et al. The increasing incidence of anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2007;68(2):116-21.
- Flaherty ML, Tao H, Haverbusch M, et al. Warfarin use leads to larger intracerebral hematomas. *Neurology* 2008;71(14):1084-9.
- Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Manolescu A, Styrkarsdottir U, Helgadottir A, Gschwendtner A. Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. *Ann Neurol* Oct 2008;64(4):402-9.
- Gazit Y, Nahir A, Grahame R, Jacob G. Dysautonomia in the joint hypermobility syndrome. *Am J Med* 2003;115:33–40.
- Gould DB, Phalan FC, van Mil SE. Role of COL4A1 in small-vessel disease and hemorrhagic stroke. *N Engl J Med.* Apr 6 2006;354(14):1489-96.
- Gould DB, Phalan FC, van Mil SE, Sundberg JP, Vahedi K, Massin P, Bousser MG, Heutink P, Miner JH, Tournier-Lasserre E, et al. Role of COL4A1 in small-vessel disease and hemorrhagic stroke. *N Engl J Med.* 2006; 354:1489–96. .

- Grau AJ, Buggle F, Becher H. Recent bacterial and viral infection is a risk factor for cerebrovascular ischemia: clinical and biochemical studies. *Neurology*. Jan 1998;50(1):196-203.
- Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke*. May 2004;35(5):1147-52.
- Grau AJ, Fischer B, Barth C, Ling P, Lichy C, Buggle F. Influenza vaccination is associated with a reduced risk of stroke. *Stroke*. Jul 2005;36(7):1501-6..
- Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, Samani NJ, et al (2004) The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet* 36:233–239.
- Hacke W, Kaste M, Skyhoj Olsen T, Bogousslavsky J, Orgogozo JM (2000). Acute treatment of ischemic stroke. European Stroke Initiative (EUSI).
- Hegele RA, Ban MR, Anderson CM, et al. Infection-susceptibility alleles of mannose-binding lectin are associated with increased carotid plaque area. *J Invest Med*. May 2000;48(3):198-202.
- Huang CY, Yu YL, Woo KW, Chan FL. Cerebral haemorrhage in an Urban Chinese population. *Funct Neurol* 1986;1(3):213-21.
- John W. Petersen A, J. Yellowlees Douglas b Tenascin-X, collagen, and Ehlers–Danlos syndrome: Tenascin-X gene defects can protect against adverse cardiovascular events *Medical Hypotheses* 81 (2013) 443–447.
- Junqueira LC (1997). Κυκλοφορικό σύστημα. Βασική ιστολογία, 6^η έκδοση, Πασχαλίδης, Αθήνα, σελ. 291-307.
- Jilly F. Evans, Andrew D. Ferguson, Ralph T. Mosley and John H. Hutchinson. What's all the FLAP about? 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. Cell press.
- Jood K, Ladenvall C, Rosengren A Family history in ischemic stroke before 70 years of age: the Sahlgrenska Academy Study on Ischemic Stroke. *Stroke* Jul 2005;36(7):1383-7.
- Kazumi Satoh, Marie Tsukamoto, Masanobu Shindoh, Yasunori Totsuka, Teiji Oda and Ken-ichi Matsumoto. Increased Expression of Tenascin-X in Thoracic and

- Abdominal Aortic Aneurysm Tissues *Biol. Pharm. Bull.* 33(11) 1898—1902 (2010).
- Khaw BA, Narula J (1994). Antibody imaging in the evaluation of cardiovascular diseases. *J Nucl Cardiol* 1:457-476.
- Kissela BM, Alwell K, Khoury J, et al. Stroke in the young is increasing over time: temporal trends in the age of stroke incidence in a large, bi-racial population [abstract]. *Stroke* 2010;41:e224.
- Kimura Y, Takishita S, Muratani H, Kinjo K, Shinzato Y, Muratani A, Fukiyama K. *Intern Med.* 1998;37(9):736.
- Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI. Chlamydia pneumoniae as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *JAMA*. Dec 4 2002;288(21):2724-31.
- Kelly PJ, Furie KL, Kistler JP, Barron M, Picard EH, Mandell R. Stroke in young patients with hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Neurology*. Jan 28 2003;60(2):275-9.
- Kuo DS, Labelle-Dumais C, Gould DB. COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Hum Mol Genet.* 2012 Oct 15;21(R1):R97-110. Epub 2012 Aug 21.
- LaBiche R, Koziol D, Quinn TC, et al. Presence of Chlamydia pneumoniae in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke* Apr 2001;32(4):855-60.
- Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. Jun 28 2005;111(25):3481-8.
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868–874.
- Llewelyn M, Sriskandan S, Peakman M, Ambrozak DR, Douek DC, Kwok WW. HLA class II polymorphisms determine responses to bacterial superantigens. *J Immunol.* Feb 1 2004;172(3):1719-26.
- Levy E, Jaskolski M, Grubb A. The role of cystatin C in cerebral amyloid angiopathy and stroke: cell biology and animal models. *Brain Pathol.* Jan 2006;16(1):60-70.
- Löhmusaar E, Gschwendtner A, Mueller JC, Org T, Wichman E, Hamann G, et al. ALOX5AP gene and the PDE4D gene in a central European population of stroke patients. *Stroke* 2005;36: 731-736.

- Larson MG, Atwood LD, Benjamin EJ, Cupples LA, DAostino RB Sr, Fox CS, et al. Framingham Heart Study 100K project: genome-wide associations for cardiovascular disease outcomes. *BMC Med Genet.* Sep19 2007;8 Suppl 1:S5.
- Labovitz DL, Halim A, Boden-Albala B, Hauser WA, Sacco RL. The incidence of deep and lobar intracerebral hemorrhage in whites, blacks, and Hispanics. *Neurology* 2005;65(4):518-22.
- Labovitz DL, Halim AX, Brent B, Boden-Albala B, Hauser WA, Sacco RL. Subarachnoid hemorrhage incidence among Whites, Blacks and Caribbean Hispanics: the Northern Manhattan Study. *Neuroepidemiology.* 2006;26(3):147-50
- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Heart Disease and Stroke Statistics - 2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010;121(7):e46-e215
- Miller DK, Gillard JW, Vickers PJ, Sadowski S, Le'veille' C, Mancini JA, Charleson P, Dixon RAF, Ford-Hutchinson AW, Fortin R, Gautier JY, Rodkey J, Rosen R, Rouzer C, Sigal IS, Strader CD, Evans JF (1990) Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature* 343:278–281
- Mehrabian, M. *et al.* Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ. Res.* **91**, 120–126 (2002).
- Meschia JF, Brott TG, Brown RD. Phosphodiesterase 4D and 5-lipoxygenase activating protein in ischemic stroke. *Ann Neurol.* Sep2005;58(3):351-61.
- Martinez-Fernandez E, Gil-Peratita A, Garcia-Lozano R, Chinchon I, Aguilera I, Fernandez-Lopez O. Mitochondrial disease and stroke. *Stroke.* Nov 2001;32(11):2507-10.
- Meschia JF, Brott TG, Brown RD Jr, Crook R, Worrall BB, Kissela B, Brown WM, Rich SS, Case LD, Evans EW, Hague S, Singleton A, Hardy J; SWISS Study Group; ISGS Study Group; MSGD Study Group. Phosphodiesterase 4D and 5-lipoxygenase activating protein in ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2005 Sep;58(3):351-61.
- Mayo NE, Nadeau L, Daskalopoulou SS, Cote R. The evolution of stroke in Quebec: a 15-year perspective. *Neurology* 2007;68(14):1122-7.

- Morgenstern LB, Smith MA, Lisabeth LD, et al. Excess stroke in Mexican Americans compared with non-Hispanic Whites: the Brain Attack Surveillance in Corpus Christi Project. *Am J Epidemiol* 2004;160:376-83.
- Nagel MA, Cohrs RJ, Mahalingam R, Wellish MC, Forghani B, Schiller A. The varicella zoster virus vasculopathies: clinical, CSF, imaging, and virologic features. *Neurology*. Mar 11 2008;70(11):853-60.
- Νευρολογία. Marco Mumenthaler, Heinrich Mattle. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα, 2006.
- Neurology and Neurosurgery Illustrated. Kenneth Lindsay, Ian Bone. Churchill Livingstone, 3rd Edition, 1997.
- Νευρολογία, Επιτομή θεωρίας και πράξης. Δημήτρης Βασιλόπουλος. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. 200
- Peters Golden, M. et al 2005. Mechanisms of disease. Leukotrienes. Under appreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol*. 174, 589-594.
- Paganini-Hill A, Lozano E, Fischberg G, Perez Barreto M, Rajamani K, Ameriso SF. Infection and risk of ischemic stroke: differences among stroke subtypes. *Stroke*. Feb 2003;34(2):452-7.
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. Jan 28 2003;107(3):499-511.
- Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*. 2004, 131(7):1619-28.
- Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, Imes S, Fishbein MC, Clinton SK, Libby P, Lusis AJ, Rajavashisth TB (1997). Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* 150:1687-1699.

- Rundek T, Elkind MS, Pittman J, et al. Carotid intima-media thickness is associated with allelic variants of stromelysin-1, interleukin-6, and hepatic lipase genes: the Northern Manhattan Prospective Cohort Study. *Stroke*. May 2002;33(5):1420-3.
- Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. Jun 2 2005;352(22):2285-93.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J, American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2011;123(4):e18.
- Roth, D.M. & Lefer, A.M. Studies on the mechanism of leukotriene induced coronary artery constriction. *Prostaglandins* **26**, 573–581 (1983).
- Ross R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis. *N Eng J Med* **340**: 115-126.
- Rowe P, Barron D, Calkins H, Maumenee I, Tong P, Geraghty M. Orthostatic intolerance and chronic fatigue syndrome associated with Ehlers–Danlos syndrome. *J Pediatr* 1999;135:494–9.
- Silva EP, Fonseca FA, Ihara SS, Izar MC, Lopes IL, Pinto LE, Badimon JJ, TuYk S, Paiva TB, Kasinski N, de Paola AV, Carvalho AC (2002) Early benefits of pravastatin to experimentally induced atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:389–395.
- Sala, A., Bolla, M., Zarini, S., Muller-Peddinghaus, R. & Folco, G. Release of leukotriene A4 versus leukotriene B4 from human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 17944–17948 (1996).
- Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, Elkind MS, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, Hoh BL, Janis LS, Kase CS, Kleindorfer DO, Lee JM, Moseley ME, Peterson ED, Turan TN, Valderrama

AL, Vinters HV, An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association.

American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Peripheral Vascular Disease, Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. *Stroke*. 2013 Jul;44(7):2064-89. Epub 2013 May 7.

Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, Dean WB, Taylor G, van Vlijmen IM, van Haren B, Miller WL, Bristow J. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N Engl J Med*. 2001 Oct 18;345(16):1167-75.

Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S, Itabe H, Takano T (1998). Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **141**:61-75.

Scott J (2002). The pathogenesis of atherosclerosis and new opportunities for treatment and prevention. *J Neural Transm Suppl* **63**:1-17.

Schumacher H, Kaiser E, Schnabel PA, Sykora J, Eckstein HH, Allenberg JR. Immunophenotypic characterisation of carotid plaque: increased amount of inflammatory cells as an independent predictor for ischaemic symptoms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Jun 2001;21(6):494-501.

Sen S, Hinderliter A, Sen PK, Simmons J, LeGrys VA, Beck J. Association of leukocyte count with progression of aortic atheroma in stroke/transient ischemic attack patients. *Stroke*. Nov 2007;38(11):2900-5.

Samuelsson, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**, 568–575 (1983).

Schrehardt³, Eilidh Craigie², Ian J Jackson⁴, David G. Brownstein⁵, Ian L Megson⁶, and John J Mullins². Col4a1 mutation in mice causes defects in vascular function and low blood pressure associated with reduced red blood

- cell volume *Hum Mol Genet.* 2010 March 15; 19(6): 1119–1128. doi:10.1093/hmg/ddp584.
- Spanbroek, R. *et al.* Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1238–1243 (2003).
- Stehbens WE. Aneurysms and anatomical variation of cerebral arteries. *Arch Pathol* 1963;75:45-64.
- Stein M, Misselwitz B, Hamann GF, Scharbrodt W, Schummer DI, Oertel MF. Intracerebral hemorrhage in the very old: future demographic trends of an aging population. *Stroke*.2012;43(4):1126.
- Tammela T, Zarkada G, Nurmi H, Jakobsson L, Heinolainen , Tvorogov D, Zheng W, Franco CA, Murtomäki A, Aranda E, Miura N, Ylä-Herttuala S, Fruttiger M, Mäkinen T, Eichmann A, Pollard JW, Gerhardt H, Alitalo K. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nat Cell Biol.* 2011, 11;13(10):1202-13.
- Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood*.Sep 1 2000;96(5):1816-9.
- Tomoki Ikuta, Hiroyoshi Ariga and Ken-ichi Matsumoto Extracellular matrix tenascin-X in combination with vascular endothelial growth factor B enhances endothelial cell proliferation *Genes to Cells* (2000) 5, 913±927
- Toumier-Lasserve E, Iba-Zizen MT, Romero N, Bousser MG. Autosomal dominant syndrome with strokelike episodes and leukoencephalopathy. *Stroke.* Oct 1991;22(10):1297-302.
- Van Dijk EJ, Prins ND, Vermeer SE, Vrooman HA, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM (2005) C-reactive protein and cerebral small-vessel disease: the Rotterdam scan study. *Circulation* 112:900–905
- Yousry TA, Seelos K, Mayer M, et al. Characteristic MR lesion pattern and correlation of T1 and T2 lesion volume with neurologic and neuropsychological findings in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *AJNR Am J Neuroradiol.* Jan 1999; 20(1):91-100

- Young, R.N. (1999). Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? *Eur. J. Med. Chem.* 34, 671-685.
- Wick G, Perschinka H, Xu Q (1998). Autoimmunity and atherosclerosis. *Am Heart J* 138: S444-449.
- Woo D, Sekar P, Chakraborty R, et al. Genetic epidemiology of intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2005;14(6):239-43
- Zeller JA, Lenz A, Eschenfelder CC, Zunker P, Deuschl G. Platelet-leukocyte interaction and platelet activation in acute stroke with and without preceding infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jul 2005;25(7):1519-23.
- Zahuranec DB, Gonzales NR, Brown DL, et al. Presentation of intracerebral haemorrhage in a community. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006b;77(3):340-4.
- Zee RY, Cheng S, Hegener HH, Erlich HA, Ridker PM. Genetic variants of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein, and risk of incident myocardial infarction and ischemic stroke: a nested case-control approach. *Stroke.* 2006 Aug;37(8):2007.
- Zintzaras E, Rodopoulou, Sakellaridis. Variants of the arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) gene and risk of stroke: A Huge gene disease association review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008; 169: 523-532.
- Zintaras E, Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approach. *J Clin Epidemiol.* 2008;61(7):634-645.
- Yi-Chinn Weng, PhD1, Akshata Sonni, BS2, Cassandre Labelle-Dumais, PhD1, Michelle de Leau1, W. Berkeley Kauffman, MSc1, Marion Jeanne, PhD1, Alessandro Biffi, MD2,3, Steven M. Greenberg, PhD, MD3, Jonathan Rosand, MSc, MD2,3,4, and Douglas B. Gould, PhD1, *COL4A1* mutations in patients with sporadic late-onset intracerebral hemorrhage *Ann Neurol.* 2012 April ; 71(4): 470–477. doi:10.1002/ana.22682.

Εικόνες Διατριβής/sites: Medlink Neurology, Uptodate, eMedicine

Πίνακας 6: Αναλυτικά αποτελέσματα των ασθενών με array CGH
(UCSC Genome Browser, human genome build 19)

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ/ ΜΕΓΕΘΟΣ	ΘΕΣΗ	ΘΕΣΗ	ΓΟΝΙΔΙΑ
Ασθενής # 28			
DUP 1q21.1; 384.4Kb	145,415,190	145,799,602	HFE2, TXNIP, POLR3GL, ANKRD34A, LIX1L, RBM8A, GNRHR2, PEX11B, ITGA10, ANKRD35, PIAS3, NUDT17, POLR3C, RNF115, CD160, PDZK1, GPR89A
DUP 2q21.1; 76.4Kb	131,279,940	131,355,978	CFC1B, CFC1, LOC150527
DEL 2q33.1; 27.4Kb	203,246,347	203,273,759	BMPR2
DUP 3q22.3 - q23; 60.6Kb	138,663,272	138,723,861	FOXL2, C3orf72, PRR23A
DEL 5q13.2; 1.7Mb	68,935,931	70,636,824	GUSBP3, SERF1A, SERF1B, SMN1, SMN2, LOC100170939, LOC653391, GTF2H2B, NAIP, GTF2H2, LOC647859...
DUP 6p21.33; 35.9Kb	31,973,370	32,009,282	CYP21A2, TNXA, TNXB, STK19, C4A, C4B
DEL 8p23.1; 767.6Kb	7,113,661	7,881,286	FAM90A14, FAM90A13, LOC349196, FAM90A5, FAM90A20, FAM66B, DEFB109P1B, ZNF705G, DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB107B, DEFB107A, FAM90A7, FAM90A19, FAM90A18, FAM90A8, FAM90A9, FAM90A10, SPAG11A, DEFB4, FAM66E
DEL 8p23.1; 226.4Kb	12,241,093	12,467,543	FAM66A, DEFB109P1, FAM86B2
DEL 10q11.22; 852.1Kb	46,839,213	47,691,285	FAM35B, SYT15, GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25C, FAM25G, LOC642826, FAM35B2, ANTXRL
DEL 10q21.3; 108Kb	68,251,535	68,359,494	CTNNA3
DUP 11q11; 221.4Kb	54,829,323	55,050,762	TRIM48
DUP 14q32.33; 431.6Kb	106,371,690	106,803,307	KIAA0125, ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106,852,114	107,214,893	LOC100133469
DUP 17q21.31; 285.5Kb	44,408,762	44,694,283	LRRC37A, ARL17A, ARL17B, LRRC37A2, NSF
DUP 22q11.21; 5.14Kb	19,745,356	19,750,493	TBX1
DUP 22q11.23 - q12.1; 230.9Kb	25,672,585	25,903,543	IGLL3, LRP5L
Ασθενής # 39			
DUP 2q21.1; 76.4Kb	131,279,940	131,355,978	CFC1B, CFC1, LOC150527
DUP 3q22.3 - q23; 59.8Kb	138,664,024	138,723,861	FOXL2, C3orf72, PRR23A
DUP 6p21.33; 45.4Kb	31,963,844	32,009,282	C4A, C4B, CYP21A2, TNXA, TNXB, STK19

DEL 8p11.22; 122.6Kb	39,258,894	39,381,514	ADAM5P, ADAM3A
DEL 10q11.22; 852.1Kb	46,839,213	47,691,285	FAM35B, SYT15, GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25C, FAM25G, LOC642826, FAM35B2, ANTXRL
DUP 11q11; 257.7Kb	54,829,323	55,087,054	TRIM48
DUP 14q32.33; 431.6Kb	106,371,690	106,803,307	KIAA0125, ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106,852,114	107,214,893	LOC100133469
DEL 15q11.2; 290.14Kb	22,297,051	22,587,188	LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P
DUP 22q11.21; 4.14Kb	19,746,363	19,750,493	TBX1
DUP 22q11.21; 209.8Kb	20,402,633	20,612,436	RIMBP3
DUP 22q11.21; 415.5Kb	21,468,382	21,883,930	POM121L8P, RIMBP3C, RIMBP3B, HIC2, PI4KAP2
Ασθενής #139			
DEL 2q13; 102.3Kb	110862477	110964737	MALL, NPHP1
DUP 8p11.22; 122.6Kb	39258894	39381514	ADAM5P, ADAM3A
DUP 9p12 - p11.2; 153.7Kb	43505843	43659512	FAM75A6
DUP 9q32; 364.7Kb	116842555	117207250	KIF12, COL27A1, MIR455, ORM1, ORM2, AKNA, DFNB31
DUP 14q32.33; 132.8Kb	106405703	106538480	ADAM6
DUP 13q32.33; 321.3Kb	106636701	106957950	LOC100133469
DUP 15q11.2; 240.2Kb	22318597	22558756	LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P
DEL 15q15.3; 33.7Kb	43916972	43950720	CATSPER2
Ασθενής #115			
DUP 5q13.2; 577.7Kb	69732192	70309855	GTF2H2B, SERF1A, SERF1B, SMN1, SMN2, NAIP
DUP 5p11.22; 577.7Kb	39258894	39381514	ADAM5P, ADAM3A

DUP 9p12 - p11.2; 153.7Kb	43505843	43659512	FAM75A6
DEL 19q13.43; 32.9Kb	59054294	59087196	TRIM28, CHMP2A, UBE2M, LOC: MZF1, MGC2752
Ασθενής # 66			
DUP 8p11.22; 122.6Kb	39258894	39381514	ADAM5P, ADAM3A
DUP 9p12 - p11.2; 153.7Kb	43505843	43659512	FAM75A6
DUP 14q11.2; 1.044Mb	19376762	20421677	OR11H12, POTE6, P704P, OR4Q, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1
DUP 14q32.33; 132.8Kb	106405703	106538480	ADAM6
DUP 14q32.33; 396.8Kb	106561123	106957950	LOC100133469
DUP 15q11.1 - q11.2; 2.14Mb	20416244	22558756	GOLGA6L6, GOLGA8C, BCL8, PO, LOC646214, CXADRP2, LOC7279 OR4N4, OR4N3P
DUP 16p11.2 - p11.1; 261.6Kb	34482042	34743643	LOC283914, LOC146481
DUP Xp22.31; 284Kb	6129934	6413964	NLGN4X
Ασθενής #15			
DUP 2p24.3; 81.4Kb	16003312	16084734	MYCNOS, MYCN
DUP 4p16.3; 25.6Kb	1985103	2010761	WHSC2, MIR943
DUP 5q35.1; 2.1Kb	172659358	172661385	NKX2-5
DEL 8p11.22; 122.6Kb	39258894	39381514	ADAM5P, ADAM3A
DUP 13q34; 189.1Kb	110869398	111058530	COL4A1, COL4A2
DUP 14q32.33; 397.6Kb	106405703	106803307	ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106852114	107214893	LOC100133469
DUP 17q24.3; 47.51Kb	70071549	70119053	SOX9

DUP 22q11.21; 7.2Kb	19749830	19756992	TBX1
Ασθενής # 74			
DUP 8p22; 188.4Kb	15610736	15799117	TUSC3
DEL 8p11.22; 76.1Kb	39258894	39381514	ADAM5P, ADAM3A
DUP 14q32.33; 397.6Kb	106405703	106803307	ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106852114	107214893	LOC100133469
Ασθενής #82			
DEL 8p23.1; 840.4Kb	7239491	8079920	DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB107B, DEFB107A, FAM90A7, FAM90A14, FAM90A13, FAM90A19, FAM90A18, FAM90A8, FAM90A9, FAM90A10, SPAG11A, DEFB4, FAM66E, DEFB109P1B, MIR548I3
Ασθενής # 124			
DEL 8p11.22; 122.6Kb	39258894	39381514	ADAM5P, ADAM3A
DUP 14q32.33; 397.6Kb	106405703	106803307	ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106852114	107214893	LOC100133469
DEL 15q11.2; 240.2Kb	22318597	22558756	LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P
Ασθενής # 53			
DUP 2q21.1; 65.54Kb	131,285,191	131,350,727	CFC1B, CFC1, LOC150527
DUP 6p21.33; 45.5Kb	31,963,844	32,009,282	C4A, C4B, CYP21A2, TNXA, TNXB, STK19
DEL 8p23.1; 966.3Kb	7,113,661	8,079,920	FAM90A14, FAM90A13, LOC349196, FAM90A5, FAM90A20, FAM66B, DEFB109P1B, ZNF705G, DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB107B, DEFB107A, FAM90A7, FAM90A19, FAM90A18, FAM90A8, FAM90A9, FAM90A10, SPAG11A, DEFB4, FAM66E, MIR548I3
DEL 8p11.22; 122.6Kb	39,258,894	39,381,514	ADAM5P, ADAM3A
DEL 9p12 - p11.2; 2.5Mb	42,372,632	44,850,880	ANKRD20A2, ANKRD20A3, FAM95B1, FOXD4L2, FOXD4L4, AQP7P3, LOC642929, FAM75A6
DUP 11q11; 264.3Kb	54,829,323	55,093,581	TRIM48

DEL 12p13.31; 76.1Kb	9,637,323	9,713,425	
DUP 14q23.1; 1.18Kb	61,114,979	61,116,160	SIX1
DUP 14q32.33; 431.6Kb	106,371,690	106,803,307	KIAA0125, ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106,852,114	107,214,893	LOC100133469
DEL 15q11.2; 1.7Mb	20,863,313	22,558,756	BCL8, POTE8, NF1P1, LOC646214, CXADRP2, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P
DUP 17q21.31; 285.5Kb	44,408,762	44,694,283	LRRC37A, ARL17A, ARL17B, LRRC37A2, NSF
Ασθενής #42			
DUP 2p11.2; 115.9Kb	89,185,302	89,301,214	
DUP 2q21.1; 76.04Kb	131,279,940	131,355,978	CFC1B, CFC1, LOC150527
DEL 5q13.2; 1.8Mb	68,849,594	70,636,824	OCLN, GTF2H2C, GTF2H2D, LOC100272216, GUSBP3, SERF1A, SERF1B, SMN1, SMN2, LOC100170939, LOC653391, GTF2H2B, NAIP, GTF2H2, LOC647859
DEL 6p25.3; 158.7Kb	259,318	418,057	DUSP22, IRF4
DEL 6p21.33; 76.5Kb	31,369,206	31,445,711	MICA, HCP5, HCG26
DEL 8p23.1; 164.2Kb	7,239,491	7,403,681	DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB107B, DEFB107A
DEL 8p11.22; 122.6Kb	39,258,894	39,381,514	ADAM5P, ADAM3A
DEL 9p13.1; 194.2Kb	40,608,675	40,802,859	FAM75A3, FAM74A3, ZNF658
DEL 10q11.22; 852.1Kb	46,839,213	47,691,285	FAM35B, SYT15, GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25C, FAM25G, LOC642826, FAM35B2, ANTXRL
DUP 10q26.3; 161.5Kb	135,243,049	135,404,523	LOC619207, CYP2E1, SYCE1
DUP 11q11; 221.4Kb	54,829,323	55,050,762	TRIM48
DUP 14q32.33; 431.6Kb	106,371,690	106,803,307	KIAA0125, ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106,852,114	107,214,893	LOC100133469

DEL 15q11.1 - q11.2; 2.1Mb	20,481,702	22,587,188	GOLGA6L6, GOLGA8C, BCL8, POTE8, NF1P1, LOC646214, CXADRP2, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P
DUP 16p13.3; 644.9Kb	2,636,111	3,281,038	PDPK1, LOC652276, FLJ42627, KCTD5, PRSS27, LOC100128788, SRRM2, TCEB2, PRSS33, TESSP1, PRSS21, ZG16B, TMPRSS8, PRSS22, FLYWCH2, FLYWCH1, KREMEN2, PAQR4, PKMYT1, CLDN9, CLDN6, TNFRSF12A, HCFC1R1, THOC6, CCDC64B, MMP25, IL32, ZSCAN10, MGC3771, ZNF205, ZNF213, OR1F1, OR1F2P, ZNF200
DUP 16p11.2; 738.2Kb	33,034,908	33,773,134	TP53TG3B, TP53TG3
DUP 17q21.33; 2.13Kb	48,275,860	48,277,988	COL1A1
DEL 22q11.21; 164.7Kb	21,540,289	21,704,972	POM121L8P
Ασθενής # 40			
DUP 2p21; 3.6Kb	45,168,836	45,172,394	SIX3
DUP 2p11.2; 115.9Kb	89,185,302	89,301,214	
DUP 2q21.1; 76.04Kb	131,279,940	131,355,978	CFC1B, CFC1, LOC150527
DUP 2q31.1; 1.403Kb	176,988,244	176,989,646	HOXD9
DUP 3q22.3; 2.7Kb	138,663,909	138,666,565	FOXL2, C3orf72
DUP 3q24; 985bp	147,127,237	147,128,221	ZIC1
DUP 3q24; 2.9Kb	147,128,674	147,131,540	ZIC1
DUP 6p21.33; 45.4Kb	31,963,844	32,009,282	C4A, C4B, CYP21A2, TNXA, TNXB, STK19
DUP 6q24.2; 1.13Kb	144,328,742	144,329,870	PLAGL1, HYMAI
DUP 7q36.3; 10.9Kb	156,792,099	156,803,054	MNX1
DEL 8p11.22; 122.6Kb	39,258,894	39,381,514	ADAM5P, ADAM3A
DEL 10q11.22; 852.1Kb	46,839,213	47,691,285	FAM35B, SYT15, GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25C, FAM25G, LOC642826, FAM35B2, ANTXRL
DUP 10q24.31; 589bp	102,987,273	102,987,861	LBX1

DUP 11p15.5; 2.55Kb	2,017,408	2,019,960	H19, MIR675
DUP 11p15.5; 1.3Kb	2,159,630	2,160,920	IGF2, INS-IGF2
DUP 11q11; 221.4Kb	54,829,323	55,050,762	TRIM48
DEL 14q11.2; 859.5Kb	19,562,141	20,421,677	POTEG, P704P, OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1
DUP 14q32.33; 431.6Kb	106,371,690	106,803,307	KIAA0125, ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106,852,114	107,214,893	LOC100133469
DEL 15q11.1 - q11.2; 2.25Mb	20,481,702	22,729,422	GOLGA6L6, GOLGA8C, BCL8, POTE8, NF1P1, LOC646214, CXADRP2, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, GOLGA8D
DEL 15q13.1; 189.45Kb	28,606,246	28,795,693	GOLGA8F, GOLGA8G
DUP 15q26.2; 4.3Kb	96,873,441	96,877,759	NR2F2, MIR1469
DUP 16p13.3; 8.3Kb	222,875	231,196	HBA2, HBA1, HBQ1
DUP 16p13.3; 3.5Kb	2,139,648	2,143,174	PKD1, MIR1225
DUP 22q11.21; 9.4Kb	19,745,356	19,754,718	TBX1
DUP 22q13.33; 20.4Kb	51,064,242	51,084,618	ARSA
Ασθενής # 126			
DUP 2p11.2; 115.9Kb	89,185,302	89,301,214	
DUP 3q24; 51.5Kb	147,080,040	147,131,540	ZIC4, ZIC1
DEL 5q13.2; 1.7Mb	68,935,998	70,636,824	GUSBP3, SERF1A, SERF1B, SMN1, SMN2, LOC100170939, LOC653391, GTF2H2B, NAIP, GTF2H2, LOC647859
DEL 5q35.3; 152.5Kb	177,107,412	177,259,960	FAM153A
DEL 6p25.3; 80.5Kb	259,318	339,802	DUSP22
DEL 8p23.1; 566.8Kb	7,239,491	7,806,229	DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB107B, DEFB107A, FAM90A7,

			FAM90A14, FAM90A13, FAM90A19, FAM90A18, FAM90A8, FAM90A9, FAM90A10, SPAG11A, DEFB4
DEL 8p23.1; 529.1Kb	11,924,978	12,454,061	DEFB130, ZNF705D, FAM66D, LOC392196, USP17L2, FAM86B1, FAM66A, DEFB109P1, FAM86B2
DEL 8p11.22; 122.6Kb	39,258,894	39,381,514	ADAM5P, ADAM3A
DEL 10q11.22; 928.2Kb	46,763,071	47,691,285	FAM35B, SYT15, GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25C, FAM25G, LOC642826, FAM35B2, ANTXRL
DUP 15q11.1 - q11.2; 1.1Mb	19,068,230	20,135,920	OR11H12, POTE, P704P
DUP 14q32.33; 431.6Kb	106,371,690	106,803,307	KIAA0125, ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106,852,114	107,214,893	LOC100133469
DUP 19p13.3; 21.3Kb	293,26	314,516	MIER2
Ασθενής # 67			
DUP 2p11.2; 115.9Kb	89,185,302	89,301,214	
dup 8p23.1; 38.1Kb	7,113,661	7,151,815	FAM90A14, FAM90A13, LOC349196, FAM90A5
DEL 8p23.1; 164.2Kb	7,239,491	7,403,681	DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB107B, DEFB107A
DEL 8p23.1; 134.5Kb	7,671,731	7,806,229	DEFB107B, DEFB107A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB106B, DEFB106A, DEFB104A, DEFB104B, SPAG11B, SPAG11A, DEFB103B, DEFB103A, DEFB4
DEL 8p11.22; 122.6Kb	39,258,894	39,381,514	ADAM5P, ADAM3A
DEL 8q24.3; 12.8Kb	146,222,672	146,235,484	ZNF252, TMED10P, C8orf77
DEL 10q11.22; 852.1Kb	46,839,213	47,691,285	FAM35B, SYT15, GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25C, FAM25G, LOC642826, FAM35B2, ANTXRL
DUP 12q14.2; 170.1Kb	63,947,732	64,117,876	DPY19L2
DEL 14q11.2; 218.1Kb	20,203,610	20,421,677	OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1
DUP 14q32.33; 431.6Kb	106,371,690	106,803,307	KIAA0125, ADAM6
DUP 14q32.33; 362.8Kb	106,852,114	107,214,893	LOC100133469

DEL 15q11.1 - q11.2; 1.9Mb	20,549,990	22,432,687	GOLGA6L6, GOLGA8C, BCL8, POTE8, NF1P1, LOC646214, CXADRP2, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P
DEL 22q11.21; 215.9Kb	18,661,724	18,877,582	GGT3P
DEL 22q11.21; 164.7Kb	21,540,289	21,704,972	POM121L8P
DUP Xp11.23; 156.6Kb	49,198,742	49,355,322	GAGE8, GAGE2D, GAGE2A, GAGE2C, GAGE2E, GAGE4, GAGE5, GAGE12I, GAGE7, GAGE12F, GAGE2B, GAGE12D, GAGE12E, GAGE12H, GAGE12G, GAGE12C, GAGE12B, GAGE6
Ασθενής # 69			
DUP 2q21.1; 65.5Kb	131,285,191	131,350,727	CFC1B, CFC1, LOC150527
DEL 4q13.2; 90.7Kb	69,392,576	69,483,277	UGT2B17, UGT2B15
DUP 6p21.33; 45.4Kb	31,963,844	32,009,282	C4A, C4B, CYP21A2, TNXA, TNXB, STK19
DEL 8p23.1; 767.6Kb	7,113,661	7,881,286	FAM90A14, FAM90A13, LOC349196, FAM90A5, FAM90A20, FAM66B, DEFB109P1B, ZNF705G, DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB107B, DEFB107A, FAM90A7, FAM90A19, FAM90A18, FAM90A8, FAM90A9, FAM90A10, SPAG11A, DEFB4, FAM66E
DUP 8p11.22; 122.6Kb	39,258,894	39,381,514	ADAM5P, ADAM3A
DUP 14q32.33; 166.8Kb	106,371,690	106,538,480	KIAA0125, ADAM6
DUP 14q32.33; 321.25Kb	106,636,701	106,957,950	LOC100133469
DUP 22q11.21; 161.7Kb	21,722,269	21,883,930	RIMBP3C, RIMBP3B, HIC2, PI4KAP2