

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΜΟΝΑΔΕΣ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ – ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ
ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗ**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ
ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ Α΄ ΤΟΥ ΤΕΙ ΑΘΗΝΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ
CRP ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΑΣΥΜΟΜΥΤΗ ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΛΙΟΣ 2014

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΚΡΙΣΕΩΣ
ΤΗΣ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
Της Μεταπτυχιακής Φοιτήτριας Ασυμούτη Μαρίας

Εξεταστική Επιτροπή

- Τούτουζας Κωνσταντίνος, Επιβλέπων
- Κυρίτση Ελένη, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής
- Στεφανάδης Χριστόδουλος, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή η οποία ορίστηκε από την ΓΣΕΣ της Ιατρικής Σχολής του Παν. Αθηνών Συνεδρίαση τηςγια την αξιολόγηση και εξέταση της υποψήφιας κα Ασυμούτη Μαρίας, συνεδρίασε σήμερα.....

Η Επιτροπή διαπίστωσε ότι η Διπλωματική Εργασία της Ασυμούτη Μαρίας με τίτλο: **«ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ CRP ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ»** είναι πρωτότυπη, επιστημονικά και τεχνικά άρτια και η βιβλιογραφική πληροφορία ολοκληρωμένη και εμπειρισταωμένη.

Η εξεταστική επιτροπή αφού έλαβε υπ' όψιν το περιεχόμενο της εργασίας και τη συμβολή της στην επιστήμη, με ψήφους....., προτείνει την απονομή στην παραπάνω Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια την απονομή του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Master's).

Στην ψηφοφορία για τη βαθμολογία ο υποψήφιος έλαβε για το βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» ψήφουςγια το βαθμό «ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ» ψήφους.....,και για το βαθμό «ΚΑΛΩΣ» ψήφους.....Κατά συνέπεια, απονέμεται ο βαθμός«.....»

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

- | | |
|-------------------------------------|-----------------|
| • Τούτουζας Κωνσταντίνος, επιβλέπων | (υπογραφή)..... |
| • Κυρίτση Ελένη | (υπογραφή)..... |
| • Στεφανάδης Χριστόδουλος | (υπογραφή)..... |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας μου, μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Χριστόδουλο Στεφανάδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Τούτουζα για τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης, της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου κ. Ελένη Κυρίτση για τη βοήθεια, τη στήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της από την αρχή μέχρι και την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου για τη στήριξη και κατανόηση που μου έδειξε και στην οποία αφιερώνω αυτήν την εργασία .

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4-5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
ΣΚΟΠΟΣ.....	7-8
ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ	
Επιδημιολογικά δεδομένα.....	9
Παθοφisiολογία.....	10
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ	
Στηθάγχη.....	10
Οξύ Έμφραγμα Μυοκαρδίου.....	11
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΤΑΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ	
Φλεγμονή και Αθηροσκλήρυνση.....	13
C- ΑΝΤΙΔΡΩΣΑ ΠΡΩΤΕΙΝΗ (CRP)	
Δομή και Μηχανισμός δράσης.....	13
Φυσιολογική λειτουργία.....	17
Κλινική σημασία.....	17
Φυσιολογικές εκτιμήσεις.....	18
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	
Έννοιες και η διαδικασία.....	18
Ορισμός.....	19
Ιστορική αναδρομή.....	19
Χρήσεις.....	19-20
Η ευαισθησία της μεθόδου PCR.....	22
Η Επιμόλυνση της PCR.....	23
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΕΝΑΛΛΑΣΣΟΜΕΝΟΥ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ	
PFGE.....	25
Ηλεκτροφόρηση DNA.....	25
Στάδια της διαδικασίας PFGE-ηλεκτροφόρησης.....	26

Τα ένζυμα της PFGE.....	27
Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες.....	27
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΣΚΟΠΟΣ.....	29
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	29
Κριτήρια αποκλεισμού από την μελέτη.....	29
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	30
ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	
ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	33
Προετοιμασία πηκτώματος αгарόζης 2%.....	33
Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση.....	33
Ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος.....	34
ΕΝΖΥΜΟ.....	34
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	36
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	37
ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
Περιγραφικά αποτελέσματα.....	37
Στατιστικά αποτελέσματα.....	37
ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΕΣ.....	38-42
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	43-46
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	47-49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50-54

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως, όπως επίσης και στις σύγχρονες Δυτικές κοινωνίες, με πρώτη ανάμεσα τους την στεφανιαία νόσο. Διάφοροι παράγοντες κινδύνου ενοχοποιούνται για την αθηροσκλήρυνση των μεσαίων και μεγάλου μεγέθους αρτηριών, που αποτελεί την κύρια αιτία της στεφανιαίας νόσου. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου έχει αυξηθεί κατά 10% τα τελευταία χρόνια, σε ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 40 ετών.

Η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει παθοφυσιολογικούς και δημογραφικούς παράγοντες που δείχνουν να σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Οι πλέον σημαντικοί παθοφυσιολογικοί παράγοντες είναι οι στενώσεις στεφανιαίων αγγείων, η εμφάνιση αθηρωματικής πλάκας, η δημιουργία θρόμβων καθώς και η ύπαρξη προδιαθεσικών παραγόντων. Επίσης, παράγοντες που συνδέονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι το χαμηλό επίπεδο εκπαίδευσης, το χαμηλό εισόδημα και το είδος του επαγγέλματος του ασθενή.^{1,2}

Η CRP είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη οξείας φάσης. Η μέτρηση των επιπέδων της CRP μπορεί να βοηθήσει στη διαφορική διάγνωση μεταξύ φλεγμονωδών και μη φλεγμονωδών παθήσεων, στην παρακολούθηση της ενεργότητας διαφόρων νοσημάτων, καθώς και στην πρόγνωση ορισμένων ασθενειών.³ Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι μελέτες που έχουν γίνει, συνδέεται η στεφανιαία νόσος με την CRP και τον πολυμορφισμό της. Πιο πρόσφατα, η αυξημένη CRP έχει αναγνωριστεί ως ένας βιοδείκτης για καρδιαγγειακή νόσο (CVD) μαζί με τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου, όπως ο δείκτης μάζας σώματος, το κάπνισμα, ο διαβήτης, και τα επίπεδα χοληστερόλης.⁴

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση των επιπέδων και των πολυμορφισμών της CRP ως προγνωστικοί δείκτες για την εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου.

Η παρούσα εργασία αποτελείται από το γενικό και το ειδικό μέρος. Στο γενικό μέρος γίνεται αναφορά στην στεφανιαία νόσο γενικά, στην CRP, στα μοριακά της χαρακτηριστικά, στη συσχέτισή της με την στεφανιαία νόσο και

εκτενής αναφορά στη Polymerase Chain Reaction (PCR). Στο ειδικό μέρος αναφέρονται, ο σκοπός και το δείγμα της μελέτης, η μεθοδολογία, η ανάλυση, η συζήτηση των αποτελεσμάτων και τα συζήτηση.

ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

Επιδημιολογικά δεδομένα

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν σήμερα την κύρια αιτία θανάτου στις αναπτυσσόμενες χώρες και αναμένεται να γίνει το ίδιο και στις αναπτυσσόμενες χώρες μέχρι το 2020.⁵ Πρόκειται για νοσήματα στα οποία κοινός παρανομαστής είναι η παρουσία αθηροσκλήρωσης στα αγγεία του σώματος. Ανάλογα με το που βρίσκονται οι αθηρωματικές πλάκες εξαρτάται η κλινική εκδήλωση της νόσου. Έτσι, όταν προσβάλλονται οι αρτηρίες του εγκεφάλου και του τραχήλου έχουμε εκδήλωση αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, όταν προσβάλλονται οι αρτηρίες της καρδιάς (στεφανιαία αγγεία) έχουμε την εκδήλωση καρδιακών επεισοδίων (έμφραγμα μυοκαρδίου, στηθάγχη, καρδιακή ανεπάρκεια, αιφνίδιος θάνατος), ενώ όταν προσβάλλονται οι αρτηρίες των κάτω άκρων εκδηλώσεις περιφερικής αγγειοπάθειας (πόνος στα κάτω άκρα, γάγγραινα, ακρωτηριασμός σκέλους). Παρά το γεγονός ότι τα καρδιαγγειακά νοσήματα συχνά εμφανίζονται αιφνίδια με σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία των πασχόντων, στην πραγματικότητα έχουν μια μακροχρόνια υποκλινική πορεία χωρίς συμπτώματα έως ότου εκδηλωθούν κλινικά. Αυτό το στοιχείο είναι εξαιρετικά σημαντικό για την πρόληψη της εμφάνισης τέτοιων νοσημάτων στον πληθυσμό.

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το 2002 το 1/3 του συνόλου των θανάτων παγκοσμίως, αποδόθηκε στα καρδιαγγειακά νοσήματα (16,7 εκατομμύρια θάνατοι). Από αυτούς, για περίπου το 50% (7,22 εκατομμύρια) ευθυνόταν η στεφανιαία νόσος και για 5,5 εκατομμύρια ευθυνόταν το ΑΕΕ. Τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι η κύρια αιτία θανάτου στην Ευρώπη, στα οποία αποδίδονται περίπου 4 εκατομμύρια θάνατοι ετησίως. Σχεδόν, το 50% του συνόλου των θανάτων στην Ευρώπη προέρχεται από τα καρδιαγγειακά νοσήματα (55% στις γυναίκες και 43% στους άνδρες). Περίπου το 50% αυτών των θανάτων οφείλεται στη στεφανιαία νόσο και σχεδόν το 1/3 στα ΑΕΕ.^{5,6} Ενώ σύμφωνα με την μελέτη GREECS η οποία έλαβε χώρα στην Ελλάδα από τον Οκτώβριο του 2003 ως τον Σεπτέμβριο του 2004 όπου συγκεντρώθηκαν 2172 ασθενείς με διάγνωση εξόδου, οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Η ετήσια επίπτωση του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου ήταν 22,6 ανά 10.000 άτομα (34 ανά 10.000 άνδρες και 11 ανά 10.000 γυναίκες).⁶

Παθοφυσιολογία

Η αθηροσκλήρωση των στεφανιαίων αρτηριών αποτελεί την πρώτη αιτία των στεφανιαίας νόσου. Πρόκειται για μια πολύπλοκη διαταραχή που εξελίσσεται σε διάστημα πολλών ετών στην οποία εμπλέκονται διάφοροι τύποι κυττάρων και οργάνων, καθώς και διαφορές φυσιολογικές λειτουργίες. Η διεργασία της αθηροσκλήρωσης περιορίζονται στα τμήματα των αγγείων που βρίσκονται στην καρδιακή επιφάνεια. Συχνότερα εμπλέκεται η αριστερή πρόσθια κατιούσα αορτή με δεύτερη στην δεξιά στεφανιαία, ενώ λιγότερο συχνά εμπλέκεται ο περισπώμενος κλάδος της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Οι εκδηλώσεις της νόσου παρατηρούνται όταν οι απαιτήσεις του μυοκαρδίου σε οξυγόνο υπερβαίνουν την προσφορά οξυγόνου. Φυσιολογικά, οι αυξημένες απαιτήσεις καλύπτονται με αύξηση της στεφανιαίας ροής αίματος. Η αύξηση της ροής δεν είναι εφικτή στο βαθμό που θα έπρεπε όταν κάποια από τις κεντρικές στεφανιαίες αρτηρίες παρουσιάζει στένωση. Στην περίπτωση αυτή η στεφανιαία εφεδρεία ελαττώνεται και η ροή δεν αυξάνεται αρκετά ώστε να ανταποκριθεί σε συνθήκες αυξημένων απαιτήσεων, κι έτσι έχει ως αποτέλεσμα την ισχαιμία του μυοκαρδίου. Η ισχαιμία μπορεί να συνεπάγεται ανωμαλίες της συστολικής λειτουργίας και της διαστολικής χάλασης και η δυσλειτουργία μπορεί να είναι παροδική π.χ. στην περίπτωση της στηθάγχης που προκαλείται από σωματική προσπάθεια ή μόνιμη όπως συμβαίνει στο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Μέσα σε 20-30 λεπτά από την διακοπή της στεφανιαίας ροής αίματος επέρχεται ανεπανόρθωτη βλάβη του μυοκαρδίου. Η έκταση της βλάβης σχετίζεται με τον βαθμό της απόφραξης, την διάρκεια της και την παρουσία ή όχι παράπλευρων αγγείων.

Κλινικές εκδηλώσεις στεφανιαίας νόσου

Στηθάγχη

Η Στηθάγχη αποτελεί τη συνηθέστερη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου η οποία συνήθως εμφανίζεται σαν πρώτη κλινική εκδήλωση της νόσου. Η στηθάγχη είναι σπλαχνική δυσφορία στο στήθος που προκαλείται από παροδική ισχαιμία του μυοκαρδίου, τις περισσότερες φορές περιγράφεται σαν δυσφορία ή σφίξιμο η αίσθημα πλήρωσης και μπορεί να ακτινοβολεί στον τράχηλο, την κάτω γνάθο,

στον ώμο ή στο αριστερό άνω άκρο. Μερικοί ασθενείς αναφέρουν ότι αισθάνονται δύσπνοια και όχι δυσφορία. Επειδή η στηθάγχη είναι συνήθως αποτέλεσμα αθηροσκληρυντικής απόφραξης, εμφανίζεται με την σωματική προσπάθεια ή την συναισθηματική υπερένταση που αυξάνουν παροδικά τις μυοκαρδιακές απαιτήσεις σε οξυγόνο πέρα από τις δυνατότητες παροχής του.

Η στηθάγχη χαρακτηρίζεται ως σταθερή όταν εμφανίζεται μόνο με την συνύπαρξη του εγκλιτικού παράγοντα και η κατάσταση αυτή είναι σταθερή τους τελευταίους 3-5 μήνες. Συνήθως οφείλεται σε απόφραξη ενός ή περισσότερων στεφανιαίων αρτηριών σε ποσοστό >50%. Ως Ασταθής στηθάγχη ορίζεται όταν η βαρύτητα των συμπτωμάτων επιδεινώνεται απότομα, δηλαδή αυξάνεται η συχνότητα και η διάρκεια τους χωρίς να υπάρχει φανερό αίτιο της αύξησης των μυοκαρδιακών αναγκών σε οξυγόνο. Από κλινική άποψη, η ασταθής στηθάγχη εμφανίζεται με τρεις πιθανές μορφές: την σοβαρή στηθάγχη πρόσφατης έναρξης, επιδεινούμενη στηθάγχη ή στηθάγχη ηρεμίας. Η ασταθής στηθάγχη συχνότερα οφείλεται σε εξέλκωση ή ρήξη αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίου αγγείου και σχηματισμό ενδαγγειακού θρόμβου. Ενδέχεται να συμμετέχει και αύξηση του τόνου ή σπασμός της στεφανιαίας αρτηρίας. Για την διάγνωση χρησιμοποιούνται κατά περίπτωση το ηλεκτροκαρδιογράφημα και η δοκιμασία κόπωσης, ενώ οριστική διάγνωση τίθεται με την στεφανιαία αγγειογραφία.⁷

Οξύ έμφραγμα Μυοκαρδίου

Το οξύ έμφραγμα του Μυοκαρδίου (ΟΕΜ) πολλές φορές αναπτύσσεται σε κατάσταση ηρεμίας ή κανονικής δραστηριότητας και σε πολλές περιπτώσεις είναι η πρώτη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου. Στην πρόκληση του ΟΕΜ μπορεί να συντελέσουν η έντονη σωματική προσπάθεια, ιδιαίτερα ατόμου που κατά τα άλλα διάγει καθιστική ζωή και η συναισθηματική υπερένταση. Τυπικά το ΟΕΜ μπορεί να προκαλέσει έντονο πόνο που διαρκεί περισσότερο από 30 λεπτά και δεν υποχωρεί με υπογλώσσια χορήγηση νιτρογλυκερίνης. Συχνά ο ασθενής παρουσιάζει έντονο στηθαγχικό πόνο που διαρκεί 15-30 λεπτά, ναυτία, εφίδρωση και δύσπνοια. Ο πόνος πολλές φορές αντανακλά στον αριστερό βραχίονα, στην πλάτη και στο επιγάστριο. Ωστόσο η ένταση και η διάρκεια των συμπτωμάτων διαφέρει από ασθενή σε ασθενή. Περίπου το 20% των συμπτωμάτων των ασθενών δεν αναγνωρίζονται διότι τα συμπτώματα είναι ελαφρά άτυπα ή

απουσιάζουν. Η διάγνωση του OEM τίθεται με την κλινική εξέταση το ηλεκτροκαρδιογράφημα και τον έλεγχο των βιοχημικών δεικτών.⁸

Παράγοντες Κινδύνου Στεφανιαίας Νόσου

Η στεφανιαία νόσος είναι πολυπαραγοντική και θα πρέπει να εκτιμάται το σύνολο των παραγόντων που προδιαθέτουν για την ανάπτυξη τους. Οι παράγοντες κινδύνου είναι καθοριστικοί για την εκτίμηση του κινδύνου που διατρέχει ένα άτομο για την εμφάνιση της νόσου και είναι σημαντικό να αξιολογούνται γιατί μπορούν να αποτελέσουν στόχο θεραπευτικών παρεμβάσεων. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αιτιολόγησε το αιτιολογικό σύμπλεγμα της στεφανιαίας νόσου αναδεικνύοντας νέους παράγοντες κινδύνου, μερικοί που συνδέονται άμεσα με τον σύγχρονο τρόπο ζωής. Τέτοιοι παράγοντες είναι η διατροφή, η παχυσαρκία η έλλειψη φυσικής άσκησης, το ψυχοκοινωνικό άγχος η κατάθλιψη, καθώς επίσης τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και διάφοροι θρομβωτικοί μηχανισμοί στο αίμα.⁹⁻¹¹ Μέσω αυτών των μελετών έχουν αναπτυχθεί στοχαστικά μοντέλα, που αποτιμούν τον κίνδυνο εκδήλωσης στεφανιαίων συνδρόμων λαμβάνοντας υπόψη και τους προαναφερθέντες τροποποιήσιμους παράγοντες και μη, παράγοντες που επιπολάζουν τους διερευνούμενους πληθυσμούς.¹² Για να θεωρηθεί ένας παράγοντας ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου θα πρέπει να υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις από πολλές μελέτες και θα πρέπει τα αποτελέσματα των ερευνών να είναι γενικευμένα σε όλες της ομάδες του πληθυσμού. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος κατηγοριοποίησης των παραγόντων κινδύνου είναι ο διαχωρισμός τους σε τροποποιήσιμους(κάπνισμα, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, δυσλιπιδαιμίες διατροφικές συνήθειες, έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, παχυσαρκία), και σε μη τροποποιήσιμους(φύλο, ηλικία, οικογενειακό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου, γενετικοί παράγοντες).Επίσης τελευταίες μελέτες έχουν αποδείξει ότι και μερικοί βιοδείκτες φαίνεται να σχετίζονται σημαντικά με την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου¹³

Είναι ήδη γνωστό ότι η CRP είναι δείκτης, αλλά και σημαντικός παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά συμβάντα και αθηροσκλήρωση στο γενικό πληθυσμό.²⁶Επίσης σε όλους τους ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδο CRP. Η μέγιστη τιμή παρουσιάζεται 50 ώρες

μετά την έναρξη του πόνου και σε ασθενείς που αναρρώνουν ομαλά μέσα σε 7 ημέρες επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα.¹⁴

Φλεγμονή και Αθηροσκλήρυνση

Κατά την δεκαετία του 1970 η επικρατούσα αντίληψη για την αθηροσκλήρυνση ήταν ότι πρόκειται για μια νόσο που σχετίζεται με την εναπόθεση λιπιδίων πάνω στο τοίχωμα των αρτηριών, τα οποία τελικά αυξάνονται σε τέτοια βαθμό, ώστε τελικά να εμποδίζουν την παροχή αίματος στους ιστούς οδηγώντας σε καρδιαγγειακά συμβάματα όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ή το εγκεφαλικό επεισόδιο. Τα τελευταία έτη η αντίληψη αυτή έχει αλλάξει, καθώς κατανοούμε πλέον καλύτερα τους μηχανισμούς που ευθύνονται για την έναρξη αλλά και την πρόοδο της αθηρωματικής διαδικασίας. Η φλεγμονή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στους κυτταρικού και μοριακού μηχανισμούς της αθηρογένεσης και να εμπλέκεται σε όλα τα στάδια της πορείας της νόσου, τόσο στην έναρξη και την πρόοδο όσο και στα τελικά κλινικά σημεία, δηλαδή στις θρομβωτικές επιπλοκές. Πρόσφατες μελέτες έχουν σχηματίσει ένα θεμελιώδη ρόλο για τη φλεγμονή και τη διαμεσολάβηση σε όλα τα στάδια της ασθένειας αυτής από την έναρξη μέχρι την εξέλιξη και, εν τέλει, τις θρομβωτικές επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης. Αυτά τα νέα ευρήματα μας παρέχουν σημαντικούς δεσμούς μεταξύ των παραγόντων κινδύνου και των μηχανισμών της αθηρογένεσης. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η αναδυόμενη βιολογία της φλεγμονής στην αθηροσκλήρωση εφαρμόζεται άμεσα σε ασθενείς. Αύξηση των δεικτών φλεγμονής προβλέπουν εκβάσεις των ασθενών με οξεία στεφανιαία σύνδρομο, ανεξάρτητα από βλάβη του μυοκαρδίου. Επιπλέον τα επίπεδα του δείκτη φλεγμονής της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, καθορίζουν κίνδυνο αθηροσκληρωτικών επιπλοκών, προσθέτοντας έτσι προγνωστικές πληροφορίες που παρέχονται από παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου.^{15,16} Η αύξηση της CRP σε κλινικά ασταθείς ασθενείς δεν αφορούν μόνο την έκταση και τη σοβαρότητα της αθηροσκλήρωσης, καθώς μόνο το 20% των ασθενών με χρόνια σταθερή στηθάγχη και υψηλό επιπολασμό της νόσου έχουν αυξημένες τιμές CRP σε σύγκριση με το 70% των ασθενών με ασταθή στηθάγχη.¹⁵ Παρόλα αυτά που η

CRP αποτελεί τον πιο σημαντικό δείκτη φλεγμονής, υπάρχουν κι άλλες πρωτεΐνες που αυξάνονται οξείας φάση όπως είναι το ινωδογόνο και αναστολέας πλασμινογόνου-1.

C-ΑΝΤΙΔΡΩΣΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ(CRP)

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης, κατά κύριο λόγο παράγεται στο ήπαρ. Κατά τη διάρκεια σοβαρών λοιμώξεων ή μεγάλες βλάβες στους ιστούς, τα επίπεδα της CRP στο πλάσμα μπορεί να αυξηθεί έως και 1000 φορές²⁸. Αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη οξείας φάσης στην κλινική πράξη. Η μέτρηση των επιπέδων της CRP μπορεί να βοηθήσει στη διαφορική διάγνωση μεταξύ φλεγμονωδών και μη φλεγμονωδών παθήσεων, στην παρακολούθηση της ενεργότητας διαφόρων νοσημάτων καθώς και στην πρόγνωση ορισμένων ασθενειών. Μεταξύ των διαφόρων εργαστηριακών δεικτών φλεγμονής, η CRP παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, τα οποία την καθιέρωσαν σαν ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πολύτιμο εργαλείο στην κλινική πράξη. Η CRP επίσης είναι παρούσα στον σχηματισμό της αρτηριοσκληρωτικής πλάκας¹⁷

Έχει συζητηθεί μετά από μελέτες ότι οι πολυμορφισμοί CRP που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα CRP δεν επηρέαζε σημαντικά και δεν προκαλούσε αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου (CAD)^{18,19}. Σε μια μεγάλη μετά-ανάλυση σε αρχεία πάνω από 160 000 άτομα χωρίς ιστορικό αγγειακής νόσου, έδειξε, μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της CRP και του κινδύνου της στεφανιαίας νόσου και του ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου²⁰

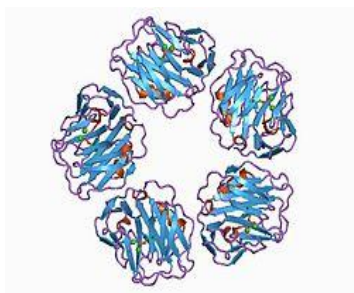
Πρόσφατα η CRP φάνηκε να είναι πιο έντονα θανατηφόρα από ό, τι τα μη θανατηφόρα αγγειακά συμβάματα, και ειδικά σε ηλικιωμένους.^{21,22} Άλλες, πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι η φλεγμονή σε γενικές γραμμές, αλλά και η ίδια η CRP, μπορεί να επιδεινώσει το έμφραγμα του μυοκαρδίου, οδηγώντας σε περισσότερο σοβαρές καρδιαγγειακές νόσους.²³⁻²⁵

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως η CRP είναι πρωτεΐνη του αίματος, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται γρήγορα σε απόκριση φλεγμονής. Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, είναι μέλος της υπεροικογένειας πεντραξίνης, που

ενεργοποιείται σε χαμηλό βαθμό κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αλλά έντονα επάγεται και εκκρίνεται μετά από τραυματισμό των ιστών και την παρουσία φλεγμονής.²⁶ Για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως πρωτεΐνη οξείας φάσης, όρος που χαρακτηρίζει εκείνες τις πρωτεΐνες που η συγκέντρωσή τους αυξάνει κατά τουλάχιστον 25% κατά την διάρκεια της φλεγμονής, σε επίπεδα πλάσματος 24-48 ώρες, σύμφωνα με τους (Tillet και Francis 1930) όπου ονομάστηκε έτσι επειδή διαπιστώθηκε ότι στο αίμα ασθενούς με οξεία πνευμονία σχηματιζόταν ίζημα, παρουσία του πολυσακχαρίτη C της μεμβράνης του πνευμονόκοκκου και των ιόντων ασβεστίου.²⁷ Πιο πρόσφατα, η αυξημένη CRP έχει αναγνωριστεί ως ένας βιοδείκτης για καρδιαγγειακή νόσο (CVD) μαζί με τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου, όπως ο δείκτης μάζας σώματος, το κάπνισμα, ο διαβήτης, και τα επίπεδα χοληστερόλης. Άτομα με αυξημένα επίπεδα CRP αντιμετωπίζουν τριπλάσιο κίνδυνο καρδιακής προσβολής σε σχέση με εκείνους που έχουν χαμηλά επίπεδα. Πρόσφατες όμως επιστημονικές έρευνες έχουν αποκαλύψει τη σημασία που διαδραματίζει η CRP και στα καρδιαγγειακά νοσήματα, αναδεικνύοντας τον ρόλο της στις διεργασίες αθηροσκλήρωσης και αθηροθρομβογένεσης, με αποτέλεσμα την αύξηση των πιθανοτήτων ανάπτυξης καταστροφικών καρδιαγγειακών επεισοδίων.

Δομή και Μηχανισμός Δράσης CRP

Η CRP είναι πρωτεΐνη (β-σφαιρίνη) που ανήκει στην οικογένεια των πενταξινών. Διακρίνεται για τη φυλογενετική σταθερότητά της, καθώς και γιατί εμφανίζει ελάχιστες διαφορές μεταξύ των διαφόρων ζωικών ειδών. Αποτελείται από πέντε υπομονάδες (πολυπεπτίδια) των 206 αμινοξέων που διατάσσονται συμμετρικά γύρω από ένα κεντρικό άξονα και η δράση της διακρίνεται σε ευοδωτική και ανασταλτική.^{28,29}



Εικόνα 1: Μοντέλο πρωτεΐνης

A. Ευοδωτική δράση

Κάθε υπομονάδα πολυπεπτιδίων συνδέεται με ιόντα ασβεστίου (Ca^{++}) τα οποία βοηθούν στην ένωση του μορίου με τη φωσφοχολίνη και τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τη φαγοκυττάρωση των συνδεδεμένων με τη CRP υποστρωμάτων. Με παρόμοια διαδικασία βοηθά την οψωνοποίηση και την καταστροφή των μικροβίων.³⁰ Η CRP έχει ακόμη τη δυνατότητα σύνδεσης με το πυρηνικό υλικό (χρωματίνη, ιστόνες, RNA) που προκύπτει από την ιστική καταστροφή, διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό την κάθαρσή του. Τέλος, η CRP μπορεί να συνδεθεί απουσία ιόντων Ca^{++} με τον C1q υποδοχέα, τους Fc υποδοχείς των ουδετεροφίλων και των μακροφάγων και κυρίως με κατιονικά πολυμερή, όπως οι πρωτεΐνες.^{31,32}

B. Κατασταλτική δράση

- α) Ελαττώνει την παραγωγή υπεροξειδίου από τα ουδετερόφιλα.
- β) Μειώνει την έκφραση της L-σελεκτίνης και, κατά συνέπεια, και την ικανότητα προσκόλλησης των ουδετεροφίλων στο ενδοθήλιο των αγγείων.
- γ) Διεγείρει τη σύνθεση του ανταγωνιστή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1Ra)³³.

Γενετική

Το υπεύθυνο γονίδιο για την παραγωγή και τη σύνθεση της CRP βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωματοσώματος 1.³³⁻³⁴ Διάφοροι παράγοντες, κυρίως οι ιντερλευκίνες 1 και 6 (IL-1, IL-6), ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNFα), αυξητικοί παράγοντες, όπως της ινσουλίνης, ο ηπατικός, των ινοβλαστών κ.ά., επιδρούν απευθείας ή έμμεσα αυξάνοντας τη γονιδιακή μεταγραφή και την παραγωγή από το ήπαρ των πρωτεϊνών οξείας φάσης. Το όλο σύστημα είναι αρκετά πολύπλοκο, ενώ δεν είναι γνωστή η εξωηπατική σύνθεση και ο μηχανισμός παραγωγής της CRP στο σύνολό του.³⁵

Φυσιολογική Λειτουργία

Ο ακριβής in vivo ρόλος της CRP δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά τις ιδιότητές του είναι σύμφωνες με έναν θεμελιώδη ρόλο ως έναν μη ειδικό μηχανισμό άμυνας. Σε εμφάνιση βλάβη ιστού ή μόλυνση, η σύνθεση της CRP εμφανίζεται στα ηπατοκύτταρα των οποίων η δραστηριότητα διεγείρεται από κυτοκίνες, και συγκεκριμένα την ιντερλευκίνη (IL) -6, IL-1β, και παράγοντα νέκρωσης όγκου. Υπό την παρουσία ιόντων ασβεστίου, η CRP συνδέεται με πολυσακχαρίτες από βακτήρια, μύκητες και παρασίτων. Επιπλέον, η CRP συνδέεται με φωσφορυλοχολίνη, φωσφατιδυλοχολίνες, και νουκλεϊκά οξέα, και δείχνει μια μη εξαρτώμενη από το ασβέστιο σύνδεση με κατιονικά μόρια όπως πρωταμίνη, ηπαρίνη, και ιστόνες¹

Μόλις δεσμευτεί, CRP γίνεται ένας ισχυρός ενεργοποιητής του κλασσικού συστήματος συμπληρώματος και μπορεί να προωθήσει οψωνινοποίηση και φαγοκυττάρωση τις ξένες ουσίες. Είναι η πιο σταθερή, αυξημένη και ταχύτερη αντίδραση πρωτεϊνών οξείας φάσης (βιολογική ημιζωή 19 h), γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι μέρος της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Οι συγκεντρώσεις μπορεί να αυξηθούν 1.000 φορές ή περισσότερο εντός 24-48 ωρών της βλάβης του ιστού.³⁶

Κλινική σημασία

Λόγω της ταχύτητας και του μέγεθος της CRP έχει ιστορικά χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει και να προβλέψει την έκβαση σε διάφορες μολυσματικές, φλεγμονώδεις και νεκρωτικές διαδικασίες και να εκτιμήσει την αποτελεσματικότητα της αγωγής για αυτές τις διαδικασίες. Ήπια φλεγμονή και ιογενείς λοιμώξεις προκαλεί ενεργοποίηση της CRP και αυξάνεται από 10 έως 50 mg / L, ενώ σε μια ενεργό φλεγμονή και σε βακτηριακές λοιμώξεις προκαλούν γενικά συγκεντρώσεις μεταξύ 50 και 200 mg / L ³⁶. Σε πιο σοβαρές λοιμώξεις και τραύματα μπορεί να αυξηθεί έως > 200 mg / L. Ως ένα ευαίσθητο αλλά μη ειδικό δείκτη φλεγμονής, οι συγκεντρώσεις CRP πρέπει πάντα να ερμηνεύονται στο πλαίσιο του ιστορικού του ασθενούς, κατά προτίμηση με ανασκόπηση των προηγούμενων αποτελεσμάτων.

Φυσιολογικές εκτιμήσεις

A. Η ηλικία και το φύλο.

Στις περισσότερες μελέτες δεν έχουν αναφέρει κάποια σχέση μεταξύ της ηλικίας (εύρος 20-70 έτη) όπου οι συγκεντρώσεις της CRP να είναι αυξημένες. Όμως, σε δύο τουλάχιστον μελέτες ανέφεραν μια μικρή αύξηση των συγκεντρώσεων CRP σχετικά με την ηλικία. Στη μεγαλύτερη μελέτη που έγινε μέχρι σήμερα, η οποία περιελάμβανε 15 770 γυναίκες, μόνο μια μικρή αλλαγή στη συγκέντρωση CRP όσο αναφορά την ηλικία παρατηρήθηκε: όπου οι μέσες συγκεντρώσεις CRP για τα άτομα 45-54, 55-64, 65-74 και ≥ 75 ετών ήταν 1.31, 1.89, 1.99, και 1.52 mg / L, αντίστοιχα.³⁷

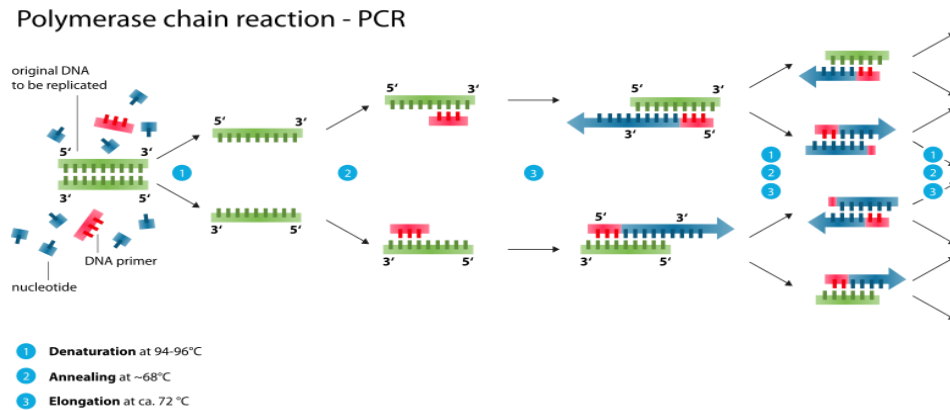
B. Εποχική διακύμανση.

Επιπλέον, υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία σχετικά με τις συγκεντρώσεις CRP και εποχικούς κύκλους. Σε μια ομάδα από 24 ηλικιωμένα άτομα (ηλικίας ≥ 75 ετών) των οποίων γινόταν συλλογή αίματος κάθε μήνα για 1 χρόνο, παρατηρήθηκε αλλαγή από 3,7 mg / L μεταξύ χειμώνα και το καλοκαίρι, χωρίς καμία ένδειξη καμία μόλυνσης.³⁷

Polymerase Chain Reaction (PCR): Έννοιες και η διαδικασία

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια από τις πιο χρήσιμες και πολυχρησιμοποιούμενες μοριακές μεθόδους. Σε μια τέτοια αντίδραση το μόριο που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα (DNA ή RNA) πολλαπλασιάζεται δίνοντας πολλά πανομοιότυπα με το αρχικό αντίγραφο. Η μέθοδος στηρίζεται στη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση (ανθεκτικό στις υψηλές θερμοκρασίες), που απομονώθηκε από μετασχηματισμένα κύτταρα E.coli με το αντίστοιχο γονίδιο του θερμόφιλου βακτηρίου *Thermus aquaticus*. Η μέθοδος είναι γρήγορη, εύχρηστη και μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλές περιπτώσεις όπου η ποσότητα του αρχικού δείγματος είναι ελάχιστη και απαιτείται αξιοπιστία. Για κάθε αντίδραση κατασκευάστηκαν δύο εκκινητές (μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια) οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με τις ακραίες περιοχές του προς αντίδραση μορίου. Αφού γίνει η αποδιάταξη του μορίου-μήτρα και οι εκκινητές προσδεθούν στις αντίστοιχες θέσεις, το ένζυμο DNA πολυμεράση αρχίζει να επιμηκύνει με φορά 3' προς 5' τους

εκκινητές προσθέτοντας συμπληρωματικά νουκλεοτίδια. Σο είδος των εκκινητών που χρησιμοποιούνται είναι βασικό για την επιτυχία μιας αντίδρασης PCR, γιατί χωρίς αυτούς δεν μπορεί να γίνει σωστή πρόσδεση της DNA πολυμεράσης.³⁸



Εικόνα 2

Ορισμός PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών. Η PCR είναι μία in vitro μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων.^{39,40}

Ιστορική Αναδρομή PCR

Το 1971 στο περιοδικό Journal of Molecular Biology από Kleppe και τους συνεργάτες του, περιγραφικέ πρώτη φορά μία μέθοδο που χρησιμοποιεί μια ενζυματική δοκιμασία για να αναπαράγουν ένα σύντομο εκμαγείο DNA με εκκινητές invitro .¹ Ωστόσο, αυτή η πρώιμη εκδήλωση της βασικής αρχής της PCR δεν έλαβε μεγάλη προσοχή. Το 1983 ο Mullis ανέπτυξε την μέθοδο της PCR, εργαζόμενος σε μία από τις πρώτες εταιρείες βιοτεχνολογίας. Στο περιοδικό Scientific American , ο Mullis εξηγεί τη διαδικασία ως εξής: «Ξεκινώντας με ένα μόνο μόριο του DNA γενετικού υλικού, η PCR μπορεί να παράγει 100 δισεκατομμύρια παρόμοια μόρια. Η αντίδραση για να γίνει δεν απαιτεί τίποτα

περισσότερο από ένα δοκιμαστικό σωλήνα, μερικά αντιδραστήρια, και μια πηγή θερμότητας. »⁴⁰

Του απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993 για την εφεύρεση του, ¹ επτά χρόνια μετά ο ίδιος και οι συνάδελφοί του στο παρουσίασαν για πρώτη φορά την εφεύρεσή του.

Χρήσεις PCR

Η PCR είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis,^{33,41} και έχει την δυνατότητα ανίχνευσης ενός μόνο DNA μορίου σε ένα μείγμα. Μικροποσότητες RNA μπορούν επίσης να αναλυθούν με τον ίδιο τρόπο, μετά τη μεταγραφή τους σε DNA από την ανάστροφη τρανσκριπτάση (RT-PCR – reverse transcription PCR). Η PCR στις μέρες μας είναι μια απαραίτητη τεχνική που χρησιμοποιείται στην ιατρική και βιολογική έρευνα.^{42,43} Αυτά περιλαμβάνουν την κλωνοποίηση του DNA, την φυλογένεση, την λειτουργική ανάλυση των γονιδίων, την διάγνωση κληρονομικών ασθενειών και η ανίχνευση και διάγνωση των μολυσματικών ασθενειών. Επίσης η PCR επιτρέπει την ταχεία και εξαιρετικά ειδική διάγνωση μολυσματικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προκαλούνται από βακτήρια ή ιούς.⁴³

Η PCR επιτρέπει επίσης την αναγνώριση των μη καλλιεργήσιμων ή αργής ανάπτυξης μικροοργανισμών όπως μυκοβακτηρίδια, αναερόβια βακτήρια, ή ιούς από καλλιέργεια ιστού προσδιορισμούς και ζωικά μοντέλα. Η βάση για την PCR διαγνωστικές εφαρμογές στη μικροβιολογία είναι η ανίχνευση μολυσματικών παραγόντων και η διάκριση των μη παθογόνων στελεχών από παθογόνους δυνάμει των συγκεκριμένων γονιδίων.^{33,43}

Σχεδόν όλες οι εφαρμογές της PCR χρησιμοποιούν μία DNA πολυμεράση σταθερό στη θερμότητα, όπως Taq πολυμεράση (ένα ένζυμο που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*). Αυτή η DNA πολυμεράση συναρμολογεί ένα νέο κλώνο DNA από το DNA buildingblock, τα νουκλεοτίδια χρησιμοποιώντας μονόκλωνο DNA ως μήτρα και DNA ολιγονουκλεοτίδια (που ονομάζεται επίσης εκκινητές DNA), τα οποία απαιτούνται για την έναρξη της σύνθεσης του DNA. Η συντριπτική πλειοψηφία των μεθόδων PCR χρησιμοποιούν θερμικούς κύκλους, δηλαδή εναλλάξ θέρμανση και ψύξη του δείγματος PCR, μέσω

μιας καθορισμένης σειράς βημάτων της θερμοκρασίας. Στο πρώτο στάδιο, τα δύο σκέλη της διπλής έλικας του DNA διαχωρίζονται φυσικά σε υψηλή θερμοκρασία σε μια διαδικασία που ονομάζεται DNA τήξης. Στο δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία μειώνεται και οι δύο κλώνοι του DNA γίνονται πρότυπα για το DNA πολυμεράση για να ενισχυθεί επιλεκτικά το DNA στόχου. Η εκλεκτικότητα της PCR προκύπτει από τη χρήση των πριμοδοτών που είναι συμπληρωματικά προς την περιοχή DNA στόχο για ενίσχυση υπό ειδικές συνθήκες θερμικού κύκλου.



Εικόνα 3: Ειδικό μηχάνημα για PCR(thermar cycler)

Η τυπική αντίδραση PCR περιέχει:

- i. μήτρα DNA
- ii. Ζευγάρι εκκινητών
- iii. Ταq πολυμεράση
- iv. dNTPs
- v. MgCl₂
- vi. Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα

- H₂O. Το νερό πρέπει να είναι αποστειρωμένο, χωρίς νουκλεάσες. PCR Buffer: είναι το ρυθμιστικό διάλυμα που εξασφαλίζει τις ιδανικές συνθήκες για την δράση της πολυμεράσης (κυρίως του pH και της αλατότητας κ.α.)
- pH: βασικός παράγοντας στην ορθή λειτουργία και τη πιστότητα της πολυμεράσης. Το ιδανικό pH θεωρείται γύρω στο 8.4, ενώ για μήτρα μεγάλου μήκους προτείνεται το pH 9.0.
- Αλατότητα: επηρεάζει σημαντικά τη αποδιάταξη της μήτρας DNA και την υβριδοποίηση των εκκινητών σε αυτήν. Έτσι, η αντιγραφή μικρού μεγέθους DNA επιτυγχάνεται καλύτερα σε υψηλή συγκέντρωση KCl. Ωστόσο υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να αναστείλουν τη λειτουργία της πολυμεράσης¹
- MgCl₂: Η συγκέντρωση του προσδιορίζεται εμπειρικά (συνήθως 1-5mM).

1. Είναι συμπαράγοντας της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου επηρεάζουν αρνητικά τη λειτουργία της ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις την πιστότητά της.
2. Σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA, αυξάνοντας την T_m και τελικά την ειδικότητα των εκκινητών.
3. Σχηματίζει διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα του ενζύμου¹

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να αποδώσουν λίγο προϊόν ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να σχηματιστούν μη ειδικά προϊόντα.

Εκκινητές: Χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 0.1- 0.6 μM . Είναι δυνατόν να περιέχουν αλληλουχίες χρήσιμες για μετέπειτα πειραματικές ανάγκες, όπως π.χ. θέσεις περιοριστικών ενζύμων.

Πρέπει να φέρουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Μήκος 15-30 βάσεων και περιεκτικότητα σε C/G 40-60% και μην έχουν δευτεροταγής δομές
- Να μην είναι συμπληρωματικές στο 3' άκρο του. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) στην οποία το 50% των εκκινητών θα υβριδοποιηθεί στη μήτρα να είναι περίπου 50-72°C και να μην διαφέρει το T_m τους πάνω από 5°C.

Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs): Χρησιμοποιούνται σε ίση συγκέντρωση και τα τέσσερα dNTPs. Προετοιμάζονται εκ των προτέρων ως μείγμα dATP+dGTP+dCTP+dTTP.

Η τελική συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιούνται είναι 200 μM το κάθε dNTP.

Πολυμεράσες: σήμερα υπάρχει πληθώρα ενζύμων που είναι διαθέσιμα

για την πραγματοποίηση της PCR. Η επιλογή του βασίζεται στις ανάγκες της μεθόδου και τα χαρακτηριστικά της πολυμεράσης. Η πρώτη θερμοσταθερή πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε στη PCR και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα, αν και υστερεί σε σύγκριση με άλλες, είναι η Taq polymerase.

Ποσότητα και ποιότητα μήτρας DNA: η ποσότητα καθώς και η ποιότητα της μήτρας του DNA είναι καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της μεθόδου. Πρέπει να ελέγχονται η ακεραιότητα και η

καθαρότητα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστούν.

Η ευαισθησία της μεθόδου- PCR

Η PCR έχει πολλή καλή ευαισθησία, σαν μέθοδος. Με τον ακριβή και κατάλληλο σχεδιασμό μπορεί να αποδώσει στο 100% της ευαισθησίας της. Τα περισσότερα προβλήματα προκύπτουν από την παράβλεψη των βασικών αρχών του σχεδιασμού και της βελτιστοποίησης. Κάθε ερευνητής που χρησιμοποιεί την PCR καλείται να ακολουθήσει αυτές τις βασικές αρχές καθώς και τα πρωτόκολλα, που ορίζουν οι διεθνείς οδηγίες.

Συνεπώς, η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται από:

- την επιλογή κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης,
- τη χρήση κατάλληλου προγράμματος σχεδιασμού των εκκινήτων,
- την εκτίμηση ποιότητας δειγμάτων,
- τον έλεγχο για τυχόν επιμόλυνση,
- τη βελτιστοποίηση ποιότητας και συγκέντρωσης αντιδραστηρίων και
- τη ρύθμιση των παραμέτρων του προγράμματος.

Η PCR συνήθως εκτελείται σε ένα όγκο αντίδρασης από 10-200 μl σε μικρά σωληνάρια αντίδρασης (0,2-0,5 ml όγκοι) σε έναν θερμικό κυκλοποιητή . Ο θερμικός κυκλοποιητής θερμαίνει και ψύχει τα σωληνάρια αντίδρασης για να επιτευχθούν οι θερμοκρασίες που απαιτούνται σε κάθε στάδιο της αντίδρασης. Οι περισσότεροι θερμικοί κυκλοποιητές έχουν θερμαινόμενα καπάκια για να αποφευχθεί η συμπύκνωση στην κορυφή του σωλήνα αντίδρασης. Παλαιότερες θερμοκυκλοποιητές δεν είχαν θερμαινόμενο καπάκι κι έτσι απαιτούσαν ένα στρώμα ελαίου στην κορυφή του μίγματος της αντίδρασης ή μια μπάλα κεριού στο εσωτερικό του σωλήνα.

Η επιμόλυνση της PCR

Η υψηλή ευαισθησία της μεθόδου ενέχει κινδύνους, συνεπώς αυτό σημαίνει, ότι το παραμικρό λάθος ή και επιμόλυνση της μήτρας του DNA, θα παρουσιάσει ψευδή αποτελέσματα.

Βασικές πηγές επιμόλυνσης του DNA είναι:

- τα προϊόντα από προηγούμενες PCR αντιδράσεις,

- η επιμόλυνση από δείγμα σε δείγμα και

το DNA που υπάρχει συνέχεια στο περιβάλλοντα χώρο του εργαστηρίου από τα άτομα ή τα αντιδραστήρια για απομόνωση DNA ή PCR.

Μέτρα για την ανίχνευση της επιμόλυνσης:

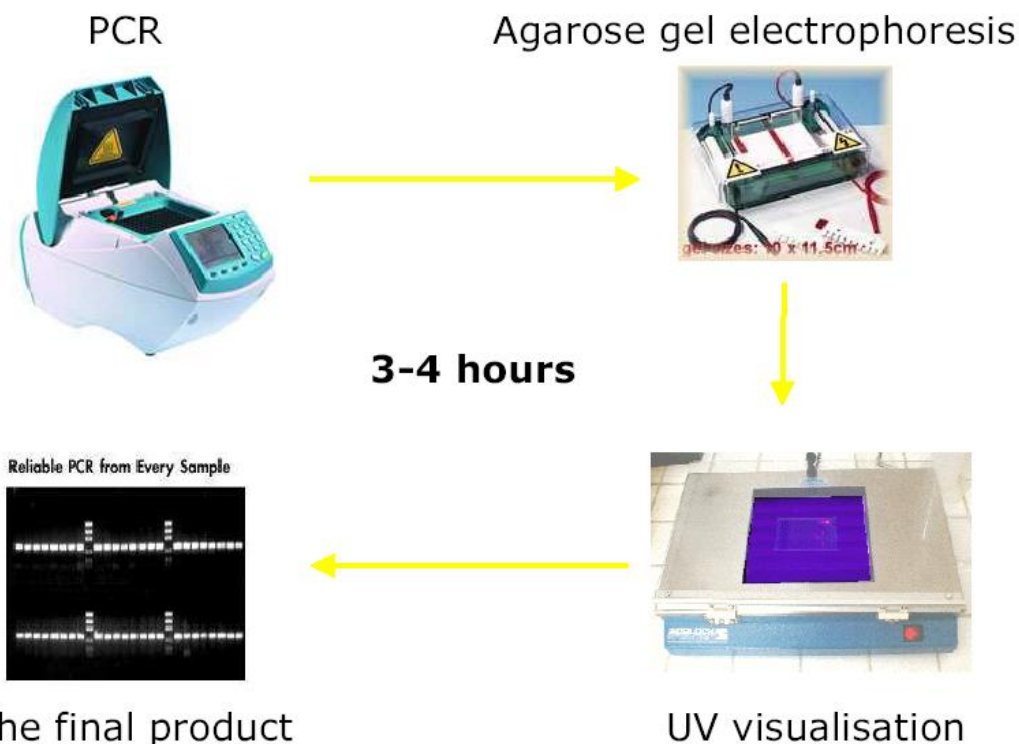
- τα δείγματα να είναι αρνητικά σε κάθε στάδιο της αντίδρασης και
- η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

Βασικά μέτρα προφύλαξης για την αποφυγή επιμόλυνσης:

- Απαραίτητη η ύπαρξη ξεχωριστών χώρων κατά την πραγματοποίηση της PCR,
- Πρακτικός πειραματικός εργαστηριακός εξοπλισμός που περιλαμβάνει 21μερίδες αντιδραστηρίων, γάντια, υλικά μιας χρήσης, tips(ακρορύγχια με φίλτρα) και

Επιπλέον ειδικά μέτρα προφύλαξης: hood, UV, πέψη με ένζυμα, DNAση, εξωνουκλεάση III.^{30,33,39,40,44,45-48}

Ηλεκτροφόρηση Εναλλασσόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE))



Το αποτέλεσμα της PCR είναι ορατό σε gel αγαρόζης, όπου μεταφέρεται το προϊόν της PCR, ηλεκτροφορείται και βάφεται με βρωμιούχο αιθίδιο. Η χρωστική αυτή επικολλάται στο DNA και φωσφορίζει κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια αποτυπώνεται φωτογραφικά. Συνεπώς, μετά την ολοκλήρωση της PCR, ακολουθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης με σκοπό να διαχωριστούν τα μόρια του DNA και να μπορούμε να διαβάσουμε το αποτέλεσμα. Ειδικότερα, στην CRP μας επιτρέπεται να "διαβάσουμε" τα επίπεδα των πολυμορφισμών της και το πόσο αυτή επηρεάζει την εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου με την αύξησή της.

Ηλεκτροφόρηση DNA

Γίνεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και τα μόρια του DNA επιμηκύνονται και ευθυγραμμίζονται με την κατεύθυνση του πεδίου, μέσα σε ένα πήκτωμα. Η κίνηση των μορίων γίνεται με ένα ιδιαίτερο τρόπο. Επίσης τα μικρότερα μόρια DNA κινούνται πιο εύκολα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Στη συνέχεια, μετά την απομάκρυνση του ηλεκτρικού πεδίου τα

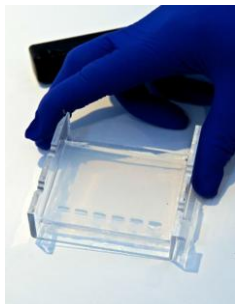
επιμηκυσμένα μόρια DNA επιστρέφουν στην αρχική χαλαρή διαμόρφωση της δομής τους. Ο ρυθμός της διαδικασίας εξαρτάται από το μέγεθος του DNA.³⁴

Ορολογία της PFGE

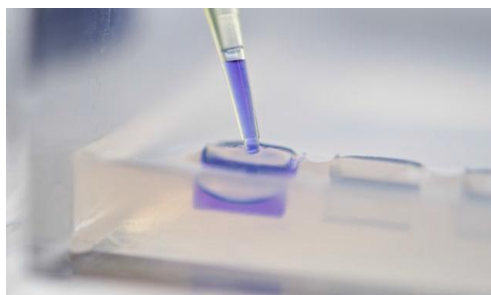
- Pulsed Field(εναλασσόμενο πεδίο) Κάθε ηλεκτροφορητική διαδικασία που χρησιμοποιεί περισσότερα του ενός ηλεκτρικά πεδία και τα οποία ενεργοποιούνται εναλλάξ.
- Reorientation Angle (γωνία επανα-προσανατολισμού του πεδίου)Η γωνία μεταξύ των κατευθύνσεων των δύο ηλεκτρικών πεδίων
- Switch Interval (Pulse Time)(χρόνος εναλλαγής πεδίου)Το διάστημα του χρόνου κατά το οποίο κάθε ένα από τα ηλεκτρικά πεδία είναι ενεργά
 - Ramping Η σταδιακή αύξηση του προηγούμενου χρόνου κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Τα στάδια της διαδικασίας PFGE- ηλεκτροφόρησης

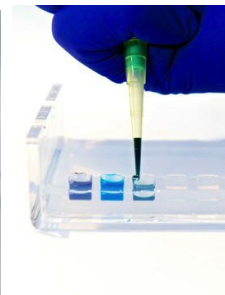
- i. απομόνωση στελέχους
- ii. εγκλωβισμός του σε πλάκα (plug) αγαρόζης (**βλ. Εικόνα 4,5,6**)
- iii. λύση του κυτταρικού τοιχώματος και εκχύλιση του DNA
 - iv. τομή του DNA από μία περιοριστική ενδονουκλεάση
 - v. ηλεκτροφόρηση σε εναλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο
 - ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση πολλών στελεχών
 - ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση δείκτη μοριακού μεγέθους χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο
 - vi. Καταγραφή αποτελεσμάτων, με φωτογράφιση οπτική ανάλυση αποτελεσμάτων ή ανάλυση με την βοήθεια υπολογιστή.



Εικόνα 4



Εικόνα 5



Εικόνα 6

Τα Ένζυμα της PFGE

(1) Ένζυμο που θα λύσει το κυτταρικό τοίχωμα

-Για οργανισμούς που η λύση είναι δύσκολη (Gram θετικοί): Λυσοζύμη, Λυσοσταφίνη

-Για οργανισμούς με πιο εύθραυστο κυτταρικό τοίχωμα (Gram αρνητικοί): αλκαλικό διάλυμα και απορρυπαντικό

(2) Πρωτεϊνολυτικό Ένζυμο

-Πρωτεΐνάση K

(3) Ένζυμο που τέμνει το DNA

-Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες

Στην περίπτωση της CRP χρησιμοποιήθηκε η τρίτη κατηγορία, καθώς θέλουμε τη διάσπαση του DNA.

Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες (ΠΕ)

-Αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων (4-8 ζεύγη βάσεων) στο DNA και τέμνουν και τις δύο έλικες

- Είναι απαραίτητη η κατάλληλη επιλογή ενζύμου,
- Η τομή του DNA σε συγκεκριμένο αριθμό τμημάτων,
- Η καλή κατανομή του μέγεθος των τμημάτων και
- Η ικανότητα του οφθαλμού ή του υπολογιστή να αναγνωρίσουν τις διαφορές μεταξύ διαφόρων προφίλ τμημάτων περιορισμού.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ CRP ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) είναι πρωτεΐνη του αίματος, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται γρήγορα σε απόκριση φλεγμονής. Για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως πρωτεΐνη οξείας φάσης, όρος που χαρακτηρίζει εκείνες τις πρωτεΐνες που η συγκέντρωσή τους αυξάνει κατά τουλάχιστον 25% κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Ο ρόλος της είναι να συνδέεται με την φωσφοχολίνη, μία πρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια νεκρών κυττάρων και βακτηρίων. Η σύνδεση αυτή προκαλεί την ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος μέσω του συμπλόκου C1q. Η CRP συντίθεται από το ήπαρ ως απάντηση σε παράγοντες που απελευθερώνονται από τα μακροφάγα και τα λιποκύτταρα. Όσον αφορά το καρδιαγγειακό, έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζει στην ανάπτυξη και εξέλιξη του Οξέος Στεφανιαίου Συνδρόμου(ΟΣΣ).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση των επιπέδων και των πολυμορφισμών της CRP ως προγνωστικοί δείκτες για την εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Δείγμα της μελέτης

Το δείγμα της μελέτης αποτέλεσαν 164 ασθενείς που εισήχθησαν στην Α' Πανεπιστημιακή Καρδιολογική Κλινική του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών, οι οποίοι έπασχαν από στεφανιαία νόσο και είχαν ένδειξη για νέο στεφανιογραφικό έλεγχο.

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη

- Ασθενείς στους οποίους δεν ήταν δυνατό να αναγνωρισθεί η ένοχη βλάβη.
- Ασθενείς με συνυπάρχουσα φλεγμονώδη ή νεοπλασματική νόσο ή οποιοδήποτε άλλο συστηματικό νόσημα για το οποίο λαμβάνουν ειδική φαρμακευτική αγωγή.
- Ασθενείς υπό αντιφλεγμονώδη αγωγή (εκτός της ασπιρίνης)

Μεθοδολογία

Στους ασθενείς της μελέτης έγινε λήψη δείγματος αίματος για την μέτρηση δεικτών φλεγμονής, θρόμβωσης και μυοκαρδιακής νέκρωσης (hs-CRP (mg/dl), interleukin-6 (IL-6 in pg/ml). Ένα δεύτερο δείγμα αίματος χρησιμοποιήθηκε για γονιδιακή ανάλυση, μέσω της διάσπασης του DNA προκειμένου να εξακριβωθεί αν οι παραπάνω ασθενείς φέρουν γονιδιακούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την παραγωγή της CRP

Καθορισμός γονοτύπου-διαδικασία

A. Απομόνωση DNA

Η συλλογή των δειγμάτων του αίματος ήταν από περιφερικό αίμα, χωρίς να απαιτείται νηστεία και μέρος του δείγματος απομονώθηκε με το QIAamp Blood Midi Kit (Spin Protocol). Τα βήματα της μεθόδου είναι τα ακόλουθα:

1. Προσθήκη 100ml πρωτεϊνάσης με πιπέττα 100ml,
2. Προσθήκη 0,3-1ml αίματος, που πρέπει να αναμιχθεί σύντομα,
3. Προσθήκη 1,2ml ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) AL και ακολουθεί έντονη ανακίνηση του μίγματος, (vortex)
4. Επώαση του μίγματος στους 70oC για 10 λεπτά,
5. Προσθήκη 1ml αιθανόλης(96-100%) στο δείγμα, ανακατεύεται αναποδογυρίζοντας το tube 10 φορές και ακολουθεί επιπλέον έντονη ανακίνηση,
6. Προσεκτική μεταφορά 15ml του διαλύματος στη στήλη QIAamp Midi και vortex 3000rpm για 3 λεπτά,
7. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση του 15ml μίγματος στη στήλη QIAamp Midi για φυγοκέντρωση,
8. Προσεκτική προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος(buffer) AW1 στη στήλη QIAamp Midi και ακολουθεί vortex 5000rpm για 15 λεπτά,
9. Προσθήκη ρυθμιστικού AW2 στη στήλη QIAamp Midi και vortex 5000rpm για 15 λεπτά,
10. Τοποθέτηση της στήλης QIAamp Midi σε καθαρό σωλήνα tube των 15ml και απόρριψη του σωλήνα που περιέχει το διήθημα και τέλος,

11. Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος(buffer) ΑΕ ή αποσταγμένο νερό με πιπέττα 200ml. Σταθεροποίηση της θερμοκρασίας δωματίου στους 15-20οC και επώαση του δείγματος για 5 λεπτά στο δωμάτιο, τελειώνοντας με vortex 5000rpm για 2 λεπτά.

12. Μεταφορά του DNA σε tubes.

B. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Μέτα την απομόνωση, ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου PCR, η οποία χρησιμεύει στον πολλαπλασιασμό εκατομμυρίων αντιγράφων ειδικών τμημάτων DNA με την βοήθεια εκκινητών. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA, που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για μία αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται in vitro τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το άκρο της μία αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το άκρο της άλλης αλυσίδας.

Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα(εκκινητές- primers) για in vitro σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυρίβονουκλεοτιδίων (dATP,dCTP,dGTP,dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει:

1. Διατήρηση των buffers, primer F, primer R και των dNTPs στον πάγο
2. Τοποθέτηση 29,75μl water for injection σε αποστειρωμένοtube(ependours φιαλίδια PCR).
3. Προσθήκη 2 μl απομονωμένου DNA,
4. 7μl buffer(New England BioLabs inc.),

5. 5μl dNTPs((dATP,dCTP,dGTP,dTTP),
6. 3μl primer F(invitrogen™, INT174F XATZIS G.),
7. 3μl primer R(invitrogen™, INT174R XATZIS G.)
8. Προσθήκη 0,25μl Taq (platinum® Taq polymerase, invitrogen) (η οποία

διατηρείται στους -20oC και βγαίνει μόνο τη στιγμή που θα χρησιμοποιηθεί και επανατοποθετείται στην ψύξη).

9. Κλείνεται το καπάκι του tube και γίνεται vortex(SCIENTIFIC INDUSTRIES INC., MODEL G-560E) για 3 δευτερόλεπτα, τέλος

10. Τοποθέτηση στο μηχάνημα T-CY της Creacon Techonogies (230Vlt)

11. Επίσης περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός ακόμα tube(Mastermix) με τις ίδιες ποσότητες buffers, primer F, primer R, των dNTPs και Taq αλλά με 31,75μl water for injection και χωρίς DNA. Χρησιμοποιείται για έλεγχο επιμόλυνσης του δείγματος της PCR.

Σε όλη τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκαν πιπέττες από 0,2μl-200μl (thermoSCIENTIFIC, FINNPIPETTE F1) και tips με φίλτρο από 10ul-200ul (Thermo SCIENTIFIC FINTIP)

Οι εκκινητές

Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής:

primer F: CACAAGAGTGGACGTGAA

primer R: CTTATAGACCTGGGCAGT

Επιλέγεται το πρόγραμμα που θα ακολουθήσει για να γίνει η PCR, όπου περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

(1) 95oC για 10m00 Rmax

(2) 95oC για 01m00 Rmax

(3) 67.5oC για 01m00 Rmax

(4) 72oC για 01m30 Rmax

(5) Repeat the steps (2) to (4), number of cycles 28.

Διάρκεια λειτουργίας 3h30m00 και η θερμοκρασία που διατηρείται είναι οι 4oC.

Γ. Έλεγχος επιτυχίας PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η ηλεκτροφοριστική κινητικότητα του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Η ηλεκτροφοριστική κινητικότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%

- Ζυγίζονται 8gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη,
- Προσθήκη 400ml διαλύματος TBE
- Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη και το μείγμα να είναι διαυγές,
- Ανακίνηση συνεχής μέχρι το μείγμα να γίνει χλιαρό, τοποθέτηση 12ml βρωμιούχο αιθίδιο και ανακίνηση με κυκλική φορά. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική ουσία. Το μόριο του περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το αντιδραστήριο αυτό είναι καρκινογόνο και η χρήση του απαιτεί μεγάλη προσοχή και προστατευτικά γυαλιά.

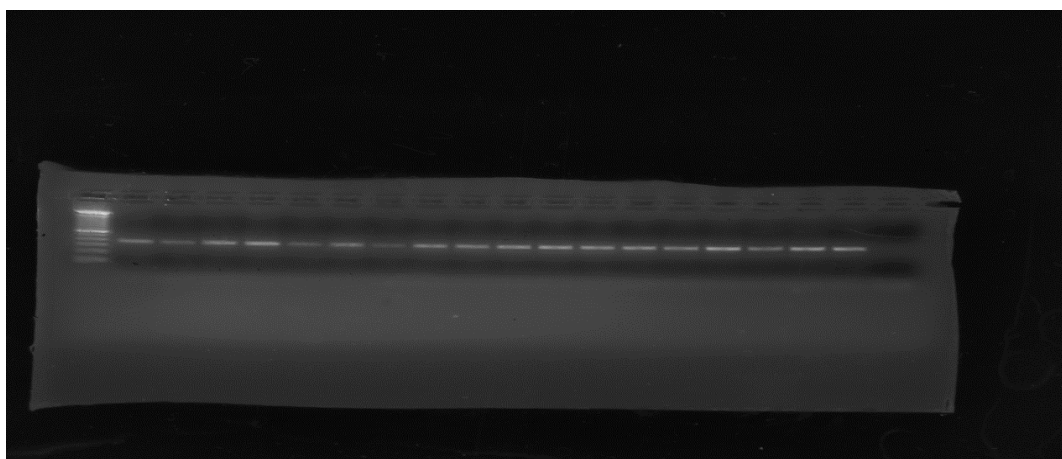
Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδική βάση για 20 λεπτά μέχρι να πήξει και να διατηρηθεί στο ψυγείο. Στο επάνω μέρος της βάσης υπάρχουν "χτένες" ώστε να δημιουργηθούν "κυψέλες"- υποδοχείς για να τοποθετηθούν οι PCR μαζί με την χρωστική ουσία.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Ανάμιξη 3μl χρωστικής με 10μl PCR,
- ανάμιξη 1μl χρωστικής με 1μl lader και
- ανάμιξη 6μl χρωστικής με 20μl PCR(Mmix) και τοποθετείται στις "κυψέλες"-υποδοχείς.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

- Η ηλεκτροφόρηση (BACACOS SCIENTIFIC SEBIA GD61D) γίνεται με σταδιακή αύξηση των Volt ξεκινώντας από τα 90 και αυξάνοντας κλιμακωτά έως τα 130Vlt για 20 λεπτά.
- Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται, εκτεθειμένο σε υπεριώδη ακτινοβολία(LIFE TECHNOLOGIES), γίνεται αποτύπωση-
- ανάλυση με κάμερα(cannon Power shot A640) και φακό(Alpha Digi Doc Pro, Alpha Innotech).
- Απεικονίζεται η επιτυχία της PCR καθώς και αν βρίσκεται στα επίπεδα
 - που αναμένεται βάσει βιβλιογραφίας.(Εικόνα 7)



Εικόνα 7. Επιτυχής PCR

ENZYMΟ

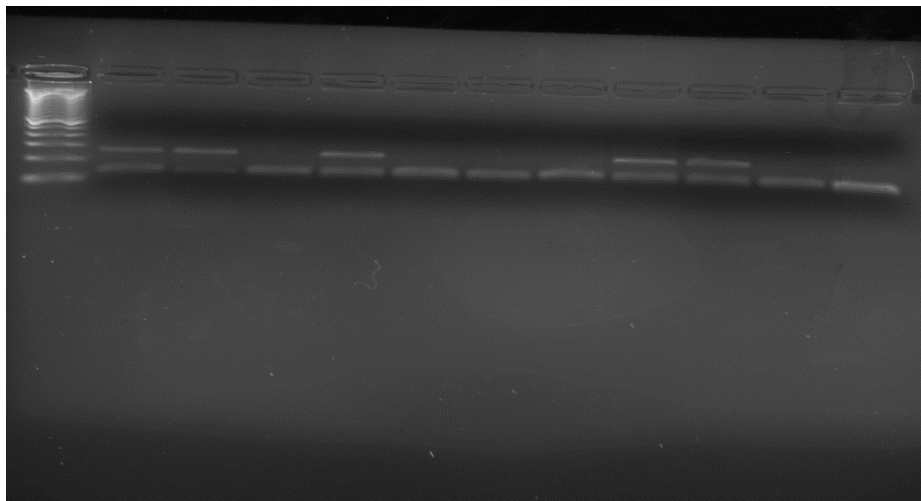
Μετά την επιτυχημένη PCR, πρέπει να καθοριστεί ο γονότυπος μέσα από την διαδικασία του ενζύμου, η οποία περιλαμβάνει:

1. Διατήρηση των buffers-X και ένζυμο-SFAN1(NEW ENGLAND BIOLABS inc.) στον πάγο,
2. τοποθέτηση 20μl water for injection σε αποστειρωμένο tube,
3. προσθήκη 20μl PCR,
4. 5μl buffer X,
5. 3 μl HPYCH 4
6. κλείνεται το καπάκι του tube και γίνεται vortex, για 3 δευτερόλεπτα και
7. τοποθέτηση στο μηχάνημα PTC-100 (Programmable Thermal
8. Controller) της MJ Research Inc για 16 ώρες.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Ανάμιξη 5μl χρωστικής με 16μl PCR,
- ανάμιξη 1μl χρωστικής με 1μl lader και
- τοποθετείται στις "κυψέλες"-υποδοχείς.

Στη συνέχεια, αφού έχει ετοιμαστεί το πήκτωμα αγαρόζης 2%, τοποθετείται στις "κυψέλες"-υποδοχείς το μείγμα και ηλεκτροφορεύεται για 45 λεπτά με κλιμακωτή αύξηση από τα 90 έως τα 120Vlt. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία εκθέτονται σε υπεριώδη ακτινοβολία και ελέγχεται το κάθε δείγμα σε ποιο γονότυπο ανήκει.(εικόνα 8)



Εικόνα 8

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας των συνεχών μεταβλητών με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov. Τα κατηγορικά δεδομένα παρουσιάζονται με απόλυτες και σχετικές (%) συχνότητες, ενώ τα συνεχή δεδομένα παρουσιάζονται με μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις. Η στατιστική δοκιμασία t-test χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα σε δύο ποσοτικές συνεχείς μεταβλητές που ακολουθούν την κανονική κατανομή, ενώ η απονομή για 33 περισσότερες από δύο. Ως στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας 5%. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS έκδοση 17.

ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σε κάθε επιστημονική μελέτη για να αποτραπεί κάθε πιθανότητα εμφάνισης χειρισμών που θα μπορούσαν να βλάψουν τα υποκείμενα που λαμβάνουν μέρος σε αυτήν, θα πρέπει να εφαρμόζονται και να τηρούνται αυστηρά οι αρχές δεοντολογίας, οι οποίες διασφαλίζουν και καθορίζουν τους ηθικούς άξονες μέσα στους οποίους αναπτύσσεται και ολοκληρώνεται μια μελέτη. Στη παρούσα μελέτη τηρήθηκαν όλες οι δεοντολογικές αρχές που διέπουν την έρευνα σε ανθρώπους και δόθηκε η σχετική άδεια από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του νοσοκομείου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Περιγραφικά αποτελέσματα

Το δείγμα της μελέτης αποτέλεσαν 164 άτομα με μέση ηλικία 67,16 έτη. Εξ αυτών 39 άτομα ήταν γυναίκες (23,8%) και 125 άντρες (67,2%). Ως προς την ηλικία το 22,5% ήταν έως 60 ετών, 61-80 ετών το 68,9% και το 8,6% είχε ηλικία >81 χρόνων. Όσον αφορά το γονότυπο της CRP, φάνηκε ότι το 28% του δείγματος ήταν ομοζυγώτες, το 41% ήταν σπάνιο και το 31% ήταν ετεροζυγώτες.

Επίσης, από τη περιγραφική ανάλυση προκύπτει ότι το 42% του δείγματος παρουσίασε ασταθή στηθάγχη και το 53% θετική εξέλιξη δηλαδή επανεμφάνισε ΟΣΣ.

Στατιστικά αποτελέσματα

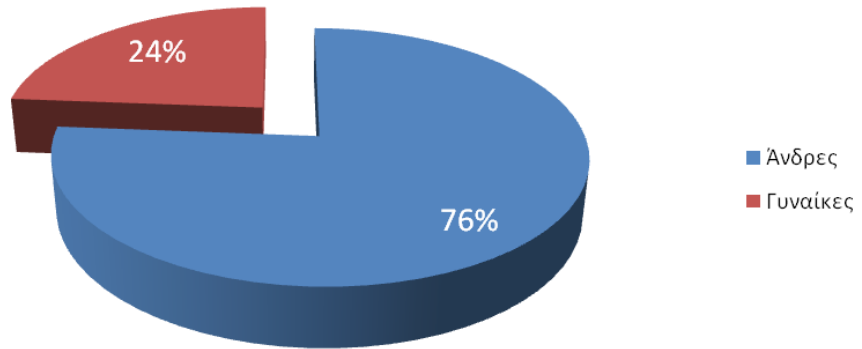
Από τη στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι τα άτομα που είναι ομοζυγώτες (GG) παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές CRP σε σχέση με τα ετερόζυγα (AG) και το σπάνιο (A.A) με $p < 0,001$. Συγκεκριμένα, ο γονότυπος (AA=σπάνιο) παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές CRP και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τον γονότυπο (GG= ομοζυγώτης) και (AG=ετεροζυγώτης), $p < 0,001$, αντίστοιχα.

Όσον αφορά, την εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου βρέθηκε ότι σχετίζεται με τις υψηλές τιμές της CRP, $p < 0,001$.

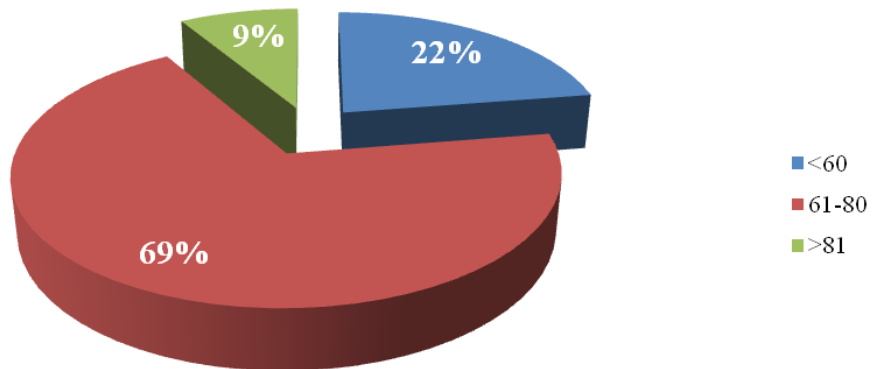
Επίσης, από την στατιστική ανάλυση βρέθηκε ότι τα άτομα με ασταθή στηθάγχη παρουσίασαν υψηλότερες τιμές CRP με στατιστικά σημαντική διαφορά $p < 0,001$.

ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

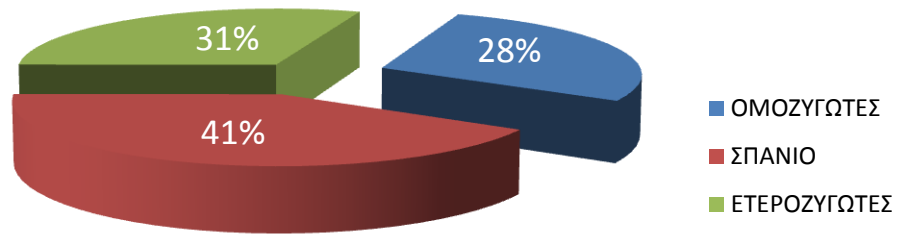
Γράφημα 1. Κατανομή του δείγματος ανάλογα με το φύλο



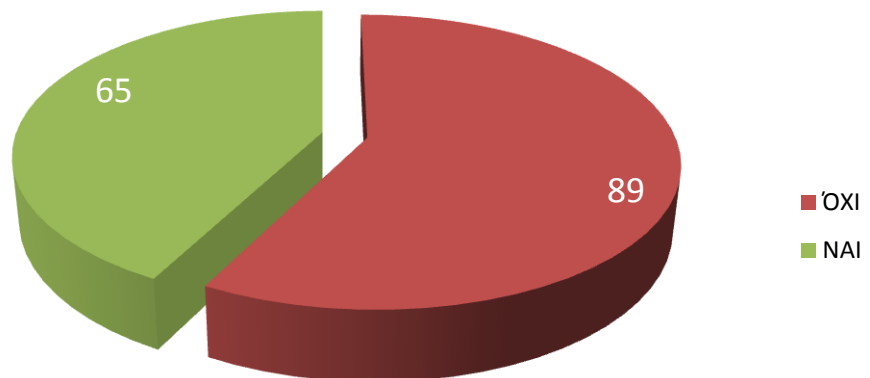
Γράφημα 2. Κατανομή του δείγματος ανάλογα με την ηλικία



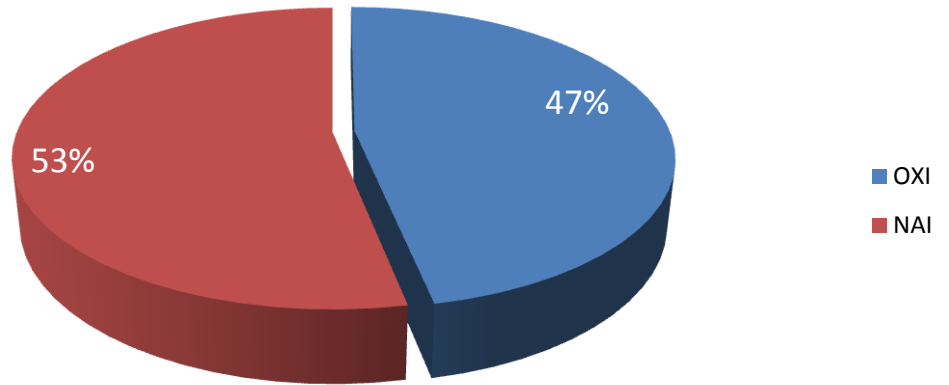
Γράφημα 3: Κατανομή του δείγματος ανάλογα με τον γονότυπο CRP



Γράφημα 4: Κατανομή του δείγματος ανάλογα με την ύπαρξη ασταθούς στηθάγχης



Κατανομή του δείγματος ανάλογα με την επανεμφάνιση ΟΣΣ

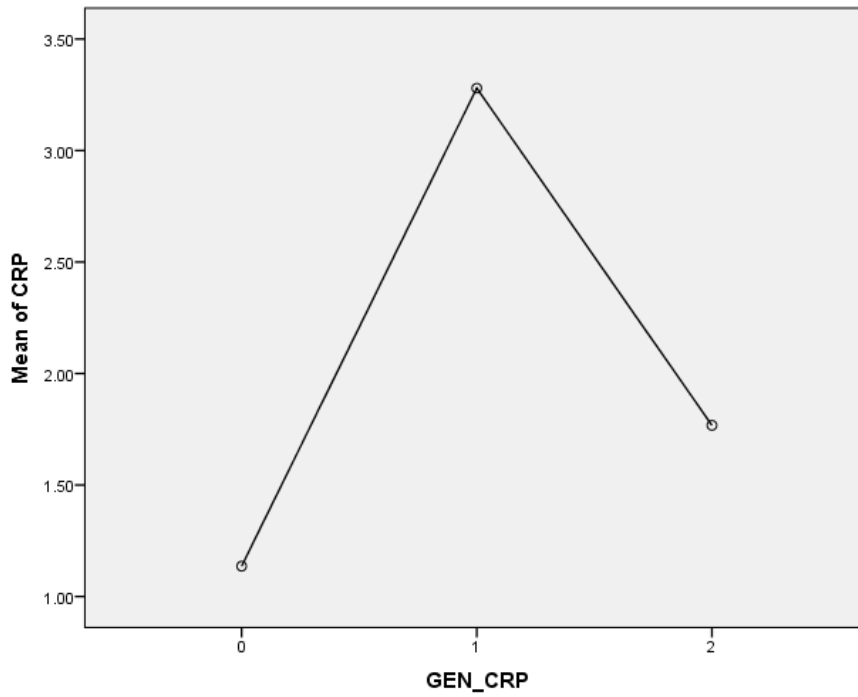


Πίνακας 1: Σύγκριση των μέσων τιμών CRP σε σχέση με τον γονότυπο

ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΤΙΜΕΣ CRP		P
	n	$\bar{x} \pm SD$	
ΟΜΟΖΥΓΩΤΗΣ	46	1,13±1,39	<0,001
ΣΠΑΝΙΟ	68	3,27±2,61	
ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΗΣ	50	1,67±1,42	

Πίνακας 2: Σύγκριση των μέσων τιμών της CRP σε σχέση με την επανεμφάνιση του Οξέος Στεφανιαίου Συνδρόμου

Επανεμφάνιση ΟΣΣ	ΤΙΜΕΣ CRP		P
	n	$\bar{x} \pm SD$	
ΟΧΙ	74	1,08±1,46	<0,001
ΝΑΙ	84	3,25±2,27	



Εικόνα 1. Εξέλιξη του ΟΣΣ σε σχέση με τις τιμές της CRP

Πίνακας 3: Σύγκριση των μέσων τιμών του CRP σε σχέση με την ύπαρξη ασταθούς στηθάγχης

Ασταθής Στηθάγχη	ΤΙΜΕΣ CRP		P
	n	$\bar{x} \pm SD$	
ΟΧΙ	89	1,27±1,17	<0,001
ΝΑΙ	65	3,55±2,64	

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η C- αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης η οποία κατά κύριο λόγο παράγεται στο ήπαρ. Τα επίπεδα της αυξάνονται γρήγορα σε απόκριση φλεγμονής. Η C- αντιδρώσα πρωτεΐνη είναι μέλος της οικογένειας της πενταξίνης που ενεργοποιείται σε χαμηλό βαθμό κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αλλά έντονα επάγεται και εκκρίνεται μετά από τραυματισμό των ιστών και την παρουσία φλεγμονής.²⁷ Για το λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως πρωτεΐνη οξείας φάσης, όρος που χαρακτηρίζει εκείνες τις πρωτεΐνες, που η συγκέντρωσή τους αυξάνεται κατά 25 % κατά την διάρκεια της φλεγμονής σε επίπεδα πλάσματος 24-48 ώρες.⁴⁹ Η CRP όπως αναφέραμε είναι μια πρωτεΐνη (β-σφαιρίνη) που ανήκει στην οικογένεια των πενταξίνων. Διακρίνεται για την φυλογενετική σταθερότητα της, καθώς και γιατί εμφανίζει ελάχιστες διαφορές μεταξύ των διαφόρων ζωτικών ειδών. Αποτελείται από πέντε υπομονάδες (πολυπεπτίδια) των 206 αμινοξέων που διατάσσονται συμμετρικά γύρω από ένα κεντρικό άξονα και η δράση της διακρίνεται σε ευοδωτική και ανασταλτική.^{1,16}

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν τα επίπεδα της CRP και ο πολυμορφισμός -3872, C/T ως προγνωστικοί δείκτες της στεφανιαίας νόσου. Από τη στατιστική ανάλυση βρέθηκε ότι τα άτομα που ήταν ομοζυγώτες (GG) παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές CRP σε σχέση με τα ετερόζυγα (GC) και το σπάνιο (CC). Τα ομόζυγα άτομα είχαν τις χαμηλότερες τιμές της CRP. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα της CRP στα ομόζυγα άτομα διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα επίπεδα των ετερόζυγων και των σπάνιων.

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί όσον αναφορά τα επίπεδα (↑ ή ↓) καταλήγουν σε κοινά συμπεράσματα, δηλαδή ότι η CRP αποτελεί δείκτη φλεγμονής και επηρεάζει την εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου. Αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει μια ποικιλία δεικτών στο πλάσμα, (CRP, ιντερλευκίνη 6 και ινωδογοννο) που φαίνεται ότι μπορούν να διαγνώσουν το μελλοντικό κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Σε μια μεγάλη μετά-ανάλυση όπου έλαβαν χώρα πάνω από 160.000 άτομα, τα οποία δεν είχαν ιστορικό αγγειακής νόσου, έδειξε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της CRP και των κινδύνων εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου, όπως επίσης και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων.⁵⁰ Παρόλα αυτά μεταξύ των διαφόρων εργαστηριακών δεικτών φλεγμονής που προαναφέραμε, η CRP παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, τα οποία την

καθιέρωσαν σαν ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πολύτιμο εργαλείο στην κλινική πράξη.

Όπως αναφέραμε τα αυξημένα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), καθίσταται ως ευαίσθητο δείκτης πλάσματος, και την έχουν αναδείξει ως ένα σημαντικό προγνωστικό παράγοντα της μελλοντικής καρδιαγγειακής νόσου και σε φαινομενικά υγιείς άνδρες και γυναίκες. Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιηθεί μια συστηματική έρευνα των νουκλεοτιδίων σε όλη την περιοχή του γονιδιώματος που περιλαμβάνει το γονίδιο CRP . Των κοινών πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) που προσδιορίζονται, αρκετές στην περιοχή του υποκινητή CRP συνδέονται στενά με τα επίπεδα της CRP . Έρευνες δείχνουν ότι τα επίπεδα βιοδεικτών και ιδιαίτερα της CRP μπορεί να προβλέψουν στεφανιαία νόσο ανεξάρτητα από τους παραδοσιακούς παράγοντες κίνδυνου όπως επίσης φλεγμονώδη βιοδεικτες μπορεί να εμφανιστούν και σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο Σύμφωνα με μελέτες τα επίπεδα της CRP μπορούν να προβλέψουν μια πιθανή εμφάνιση ασταθής στηθάγχης, ενός εμφράγματος μυοκαρδίου, αλλά και θανατηφόρα στεφανιαία επεισόδια, παρόλα αυτά δεν έχει αναφερθεί κάτι σχετικά με τον αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Επίσης σε μια επιδημιολογική μελέτη του CDC και της American Heart Association έχει αποδειχτεί ότι μεγάλο ρόλο παίζει το φύλο αλλά και φυλή, όπου μετά την χρήση τεστ CRP σε επιλεγμένους ασθενεία για να γίνει εκτίμηση των καρδιακών κινδύνων , τα αποτελέσματα ήταν αρκετά σημαντικά αφού έδειξαν ότι η μαύρη φυλή έχει αρκετά σημαντικά αυξημένα επίπεδα της CRP απ ότι η λευκή φυλή και οι γυναίκες έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα CRP από τους άνδρες.

Άλλες μελέτες δείχνουν οικογενειακές εκτιμήσεις δηλαδή ότι υπάρχει κληρονομικότητα της CRP και αυτή κυμαίνεται από 27 έως 40%, και αυτό διότι η γενετική παραλλαγή του γονιδίου της CRP μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα της CRP στο πλάσμα και μετέπειτα κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει μεμονωμένους πολυμορφισμούς μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) να σχετίζεται με τα επίπεδα της CRP. Μέχρι σήμερα, λίγες μελέτες τόσο των ανδρών όσο και των γυναικών έχουν εξετάσει ταυτόχρονα την κοινή γενετική παραλλαγή στο γονίδιο CRP, απλοτύπων, τα επίπεδα της CRP στο πλάσμα, και τον κίνδυνο επίπτωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Στη μελέτη του Ρότερνταμ, οι κοινοί απλότυποι που συνδέονται με υψηλότερα επίπεδα CRP δεν συνδέθηκαν με τον κίνδυνο της στεφανιαίας νόσου. Σε άλλες μελέτες, που

διερευνήθηκαν διάφοροι δείκτες σε ανθρώπους που έπασχαν από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο σε συνδυασμό με κατάθλιψη, έδειξαν ότι το άγχος και η κατάθλιψη σχετίζονται με φαινόμενα απορρύθμισης, όπως απότομες αυξομειώσεις στην παραγωγή της CRP και οδηγούν μακροπρόθεσμα στην απορύθμιση πολλών παραμέτρων . Ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και καρδιακή ανεπάρκεια που πάσχουν από κατάθλιψη είχαν αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών, όπως TNF α , και IL-6.⁵¹

Συμπληρωματικά, τα επίπεδα της CRP 'έχει αποδειχτεί ότι είναι αυξημένα στο έμφραγμα μυοκαρδίου, αφού σε μια μελέτη εισήρθαν στο νοσοκομείο 29 ασθενείς με OEM, με τροπονίνη μη ανιχνεύσιμη και κάεατοκιναση φυσιολογική , αποδείχτηκε ότι η CRP ήταν αυξημένη και κανένας από αυτούς δεν είχε προηγηθεί ασταθή στηθάγχη πριν την εισαγωγή, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους 22 ασθενείς που είχαν αυξημένη C αντιδρώσα πρωτεΐνη κατά την εισαγωγή τους. Στην συνέχεια της νοσηλείας τους μόνο ένας από τους 7 έπεσε στα φυσιολογικά επίπεδα και οι υπόλοιποι ασθενείς εμφάνισαν υποτροπιάζων έμφραγμα χρειάστηκαν επαναγγείωση, Στους 14 από τους 22 ασθενείς εμφάνισαν μεταφραγματική στηθάγχη και οι από τους οποίους οι 6 χρειάστηκαν και αυτοί επανγγείωση και οι υπόλοιποι 3 παρουσίασαν έμφραγμα μέσα στο νοσοκομείο, παρόλα αυτά κανένας απ αυτούς τους ασθενείς δεν κατέληξε. Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαιώνουν ότι η αυξημένη CRP στο πλάσμα στην πλειοψηφία των ασθενών με ασταθή στηθάγχη προμηνύει την εμφάνιση ενός οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.⁵²

Τα αποτελέσματα των ερευνητών που έχουν μελετήσει τα επίπεδα της CRP ως δείκτη, συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η αύξηση των επιπέδων της στο πλάσμα του αίματος παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με την παρουσία, την πορεία και την έκβαση διάφορων νόσων αλλά και της στεφανιαίας νόσου. Υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει ότι το C αλληλόμορφο σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο της στεφανιαίας νόσου. Σε μία μελέτη που έγινε σε υγιείς ενήλικες, φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός αυτός και κυρίως ο γονότυπος CC συνδέεται με τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Επίσης σε μια , έρευνα που αφορούσε διαβητικά άτομα τύπου 2 , , όταν συγκρίθηκε η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού -3872 C/T στο σύνολο του δείγματος με νόσο καρωτίδων έδειξε ότι οι ομοζυγότες AA με διαβήτη τύπου 2 εξελίσσονται νωρίτερα σε νόσο καρωτίδων , από του διαβητικούς με το αλληλόμορφο G. . Τέλος, σε άλλη έρευνα

που έχει πραγματοποιηθεί σε καυκάσιους ο γονότυπος GG ήταν σημαντικά πιο κοινός στους διαβητικούς ασθενείς.^{53,54}

ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ CRP ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η CRP είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη οξείας φάσης. Η μέτρηση των επιπέδων της CRP μπορεί να βοηθήσει στη διαφορική διάγνωση μεταξύ φλεγμονωδών και μη φλεγμονωδών παθήσεων, στην παρακολούθηση της ενεργότητας διαφόρων νοσημάτων, καθώς και στην πρόγνωση ορισμένων ασθενειών. Παρόλο που δεν αποτελεί ειδικό δείκτη, φαίνεται να σχετίζεται ισχυρά με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η ευκολία με την οποία μετράται και η διαθεσιμότητα της μεθόδου την κάνουν έναν αρκετά σημαντικό δείκτη εκτίμησης της φλεγμονώδους κατάστασης των καρδιοπαθών

Υλικό-Μέθοδος: Το δείγμα της μελέτης αποτέλεσαν 164 ασθενείς που εισήχθησαν στην Α' Πανεπιστημιακή Καρδιολογική Κλινική του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών, οι οποίοι έπασχαν από στεφανιαία νόσο και είχαν ένδειξη για νέο στεφανιογραφικό έλεγχο. Στους ασθενείς της μελέτης έγινε λήψη δείγματος αίματος για την μέτρηση δεικτών φλεγμονής, θρόμβωσης. (hs-CRP (mg/dl), Δείγμα αίματος χρησιμοποιήθηκε για γονιδιακή ανάλυση, μέσω της διάσπασης του DNA, προκειμένου να εξακριβωθεί αν οι παραπάνω ασθενείς φέρουν γονιδιακούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την παραγωγή της CRP.

Αποτελέσματα: Το δείγμα της μελέτης αποτέλεσαν 164 άτομα με μέση ηλικία 67,16 έτη. Εξ' αυτών 39 άτομα ήταν γυναίκες (23,8%) και 125 άντρες (67,2%). Ως προς την ηλικία το 22,5% ήταν έως 60 ετών, 61-80 ετών το 68,9% και το 8,6% είχε ηλικία >81 χρόνων. Από τη στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι τα άτομα που είναι ομοζυγώτες (GG) παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές CRP σε σχέση με τα ετερόζυγα (AG) και το σπάνιο (A.A) με $p < 0,001$. Συγκεκριμένα, ο γονότυπος (AA=σπάνιο) παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές CRP και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τον γονότυπο (GG= ομοζυγώτης) και (AG=ετεροζυγώτης), $p < 0,001$, αντίστοιχα.

Όσον αφορά, την εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου βρέθηκε ότι σχετίζεται με τις υψηλές τιμές της CRP , $p < 0,001$.

Επίσης, από την στατιστική ανάλυση βρέθηκε ότι τα άτομα με ασταθή στηθάγχη παρουσίασαν υψηλότερες τιμές CRP με στατιστικά σημαντική διαφορά $p < 0,001$.

Συμπέρασμα: Τα υψηλά επίπεδα της και ο ομόζυγος(GG) γονότυπος της σχετίζονται θετικά με την εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου.

LEVELS AND POLYMORPHISM OF CRP AS PROGNOSTIC FACTOR FOR THE PROGRESSION OF CORONARY HEART DISEASE

ABSTRACT

Introduction: the CRP is the most widely used acute phase protein. Measuring the levels of CRP may help in the diagnosis between inflammatory and non-inflammatory diseases, in monitoring the activity of various diseases, as well as the prognosis of certain diseases. Although is not a specific indicator, correlate strongly with cardiovascular risk. The ease which it is measured, and the availability of the method makes it attractive as an indicator for assessing the inflammatory condition of the heart disease patients.

Material-method: The sample of the study were 164 patients were introduced in the A' Department of Cardiology Hippokration General Hospital of Athens who suffered from coronary disease and had an indication for new control. To the patients of the study was taking a blood sample to measure indicators of inflammation, thrombosis. (hs-CRP (mg/dl), blood sample was used for gene analysis, via DNA cleavage, in order to verify whether the above patients carry gene polymorphisms associated with the production of CRP.

Results: the sample of the study were 164 individuals with an average age of 67,16 years. 39 of these were women (23.8 percent) and 125 men (67.2%). 22.5% was up to 60 years, 68,9% 61-80 years and 8.6% > 81 years. The statistical analysis shows that the people who are homozygous (GG) show lower values of CRP compared with the heterozygous (AG) and the rare (A.A) with $p < 0.001$. Specifically, the genotype (AA= rare) shows higher values CRP and differs significantly from the statistics genotype (GG= result) and (AG= heterozygous), $p < 0.001$, respectively. As regards the development of coronary heart disease found that is associated with the high prices of CRP , $p < 0.001$. Also, from the statistical analysis found that people with unstable angina presented higher values CRP with statistically significant difference $p < 0.001$.

Conclusion: High levels of CRP and the genotype (A.A) is associated positively with the progression of coronary heart disease.

Βιβλιογραφία

1. American Heart Association. Heart disease and stroke statistics-2003 update. AHA, Dallas, TX. 2002.
2. Li H, Cui X and Arnheim N. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1990, 87:4580-4584.
3. Boekholdt SM, Hack CE, Sandhu MS, et al. C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study 1993-2003. *Atherosclerosis* 2006;187:415-22
4. Επιδημιολογία των καρδιαγγειακών παθήσεων, παγκοσμίως. Καρδιαγγειακή Επιδημιολογία 2005; Στατιστικά στοιχεία, Γεωργία Κουρλαμπά
5. . British Heart Foundation. Coronary heart disease statistics 2005
6. Επιδημιολογία της Στεφανιαίας Νόσου στην Ελλάδα. Καρδιαγγειακή Επιδημιολογία 2005; Στατιστικά Στοιχεία, Γεωργία Κουρλαμπά
7. Mullis, Kary (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Scientific American* 262 (4): 56–61, 64–5.
8. Γενετική και Μοριακή Ανάλυση μιας φυλοσύνδετης Θερμοευαίσθητης μετάλλαξης που επηρεάζει την εκκόλαψη του νέου ατόμου στη *Drosophila melanogaster*, Διδακτορική Διατριβή, Μελά Αγγελική
9. WILSON P. D' AGOSTINO RB LEVY D, BELANGER AM, SILBERHATZ, KANNEL WB, Prediction of coronary heart disease using risk factor categories, *Circulation* 1998, 97:1827-1847
10. LABARTHE D. Edidemiology and prevention of Cardiovascular Disease. A global challenge, Maryland Asper Puvl, 1998:167-367
11. Δ. Παναγιωτάκος, Χ. Χρυσόχου, Ν. Μαρινάκης, Ι. Σκούμας, Χ Στεφανάδης, Π.Κ. Τούτουζας, Συσχέτιση μεταξύ Στεφανιαίας Νόσου και παραγόντων κινδύνου
12. Burke AP1, Tracy RP, Kolodgie F, Malcom GT, Zieske A, Kutys R, Pestaner J, Smialek J, Virmani R. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation*. 2002 Apr 30;105(17):2019-23.

13. Roit i. Essential Immunology ,7th edition ,blackwell scientific publications ,oxford 1991
14. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med
15. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. N Engl J Med. 1994; 331: 417–424
16. Τρικοίλης Ι., Καλαφάτη Μ., Ιακωβίδου Ν., Κουσκούνη Ε., Σπύρου Α., Παπαδημητρίου Λ. Γνώση συμπτωμάτων και παραγόντων κινδύνου ασθενών μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗ, 2011, 50(4):390-403.
17. Wensley F, Gao P, Burgess S, et al; C Reactive Protein Coronary Heart Disease Genetics Collaboration (CCGC). Association between C reactive protein and coronary heart disease: mendelian randomisation analysis based on individual participant data. BMJ. 2011;342:d548
18. Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, et al. Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease. N Engl J Med. 2008;359:1897–1908.
19. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. Lancet. 2010;375:132–140
20. Boekholdt SM, Hack CE, Sandhu MS et al. C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study 1993-2003. Atherosclerosis. 2006;187:415–422.
21. Sattar N, Murray HM, Welsh P, et al; Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER) Study Group. Are markers of inflammation more strongly associated with risk for fatal than for nonfatal vascular
22. Nijmeijer R, Lagrand WK, Lubbers YT, et al. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. Am J Pathol. 2003;163:269–275.
23. Celik T, Iyisoy A, Yuksel UC et al. The impact of admission C-reactive protein levels on the development of no-reflow phenomenon after

- primary PCI in patients with acute myocardial infarction: the role of inflammation. *Int J Cardiol.* 2009;136:86–88; author reply 88.
24. Mihlan M, Blom AM, Kupreishvili K, et al. Monomeric C-reactive protein modulates classic complement activation on necrotic cells. *FASEB J.* 2011;25:4198–4210
 25. Casas JP, Shah T, Hingorani AD, Danesh J, Pepys MB. C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J Intern Med.* 2008;264:295–314. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.02015.x.
 26. Inflammation and Atherosclerosis, Peter Libby, MD; Paul M. Ridker, MD; Attilio Maseri, MD
 27. Yeh ET, Palusinski RP. C-reactive protein: the pawn has been promoted to queen. *Curr Atheroscler Rep.* 2003;5:101–105. doi:10.1007/s11883-003-0080-4
 28. American Heart Association. Heart disease and stroke statistics-2003 update. AHA, Dallas, TX. 2002.
 29. Li H, Cui X and Arnheim N. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1990, 87:4580-4584.
 30. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schomig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995;92:748 –755.
 31. Deliangyris EN, Raymond RJ, Theoharides TC, Boucher WS, Tate
 32. DA, Dehmer GJ. Sites of interleuin-6 release in patients with acute coronary syndromes and in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2000;86:913
 33. Mullis, K. B. & Faloona F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a
 34. polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 1987, 155:335-350.
 35. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A.,
 36. Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230:1350–1354
 37. Li H, Cui X and Arnheim N. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the

- polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1990, 87:4580-4584.
38. Lewin, Genes VIII, Ελληνική Έκδοση, 2004
 39. Zhang YX, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*
 40. Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1990; 65: 168–172.
 41. Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985,230:1350–1354
 42. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971). "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases". *J. Mol. Biol.* 56 (2): 341–361
 43. Mullis, Kary (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Scientific American* 262 (4): 56–61, 64–5.
 44. Bartlett, J. M. S.; Stirling, D. (2003). "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". *PCR Protocols* 226. pp. 3–6.
 45. Cai, H; Caswell JL, Prescott JF (March 2014). "Nonculture Molecular Techniques for Diagnosis of Bacterial Disease in Animals: A Diagnostic Laboratory Perspective". *Veterinary Pathology* 51 (2): 341–350
 46. Salis AD (2009). "Applications in Clinical Microbiology". *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press
 47. . Deliargyris EN, Raymond RJ, Theoharides TC, Boucher WS, Tate DA, Dehmer GJ. Sites of interleuin-6 release in patients with acute coronary syndromes and in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2000;86:913.
 48. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. and Erlich H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239:487–491.
 49. Riedel K. H., Wingfield B. D., and Britz T. J. Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity
 50. enhancers. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.*, 1992, 71:69-72.

51. Riedel K. H., Wingfield B. D., and Britz T. J. Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.*, 1992, 71:69-72.
52. Mitsuhashi M. Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *J. Clin. Lab. Anal.*, 1996, 10:285-93.
53. *Inflammation and Atherosclerosis*, Peter Libby, MD; Paul M. Ridker, MD; Attilio Maseri, MD
54. Boekholdt SM, Hack CE, Sandhu MS et al. C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study 1993-2003. *Atherosclerosis*. 2006;187:415–422.
55. Karpeta H., VOLZKE, Rita GRIMM, Daniel M. ROBINSON, Candidate genetic markers and the risk of restenosis after coronary angioplasty, *Clinical Science*(2004)106,35–42.
56. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore R, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417– 424
58. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000;148: 209-214.
60. Stavroula Papaoikonomou, Dimitris Tousoulis, Nikolaos Tentolouris, Dimitris Papadogiannis, Antigoni Miliou, George Hatzis, Nikolaos Papageorgiou, Charalambos Antoniades, Christodoulos Stefanadis, The role of C-reactive protein genetic variability in the onset of carotid artery disease and adrenal function impairment in patients with diabetes mellitus type 2