

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ - ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό
Πρόγραμμα Σπουδών
«Ιατρική Χημεία»



Η συγκέντρωση της Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9) είναι υψηλή στον ορό ασθενών με παροδικό ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΤΙΑ). μια μικρή πιλοτική μελέτη ασθενών μαρτύρων.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΥ ΘΩΜΑ ΤΖΙΜΑ

Ιούνιος 2018

ΙΩΑΝΝΙΝΑ



ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Χαράλαμπος Μηλιώνης (Επιβλέπων)

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικού Τμήματος Σχολής Επιστημών Υγείας Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων.

Αλέξανδρος Τσελέπης (Μέλος)

Καθηγητής Βιοχημείας - Κλινικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων.

Γεώργιος Λιάμης (Μέλος)

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικού Τμήματος Σχολής Επιστημών Υγείας
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής	1
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
ΠΑΡΟΔΙΚΟ ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ (ΤΙΑ)	8
Αιτιολογία	9
Η φυσική ιστορία των ΤΙΑ.....	10
Κλινική Εικόνα.....	11
Ισχαιμικά σύνδρομα	11
Κλίμακες Βαρύτητας και πρόβλεψης	12
Απεικονιστικές Μέθοδοι με CT ή MRI	13
Απεικόνιση των αγγείων του τραχήλου	14
Εργαστηριακές δοκιμασίες και άλλα.....	14
Εισαγωγή στο νοσοκομείο.....	14
Θεραπεία	15
Αντιπηκτικά.....	15
Αντιαιμοπεταλιακά	16
Ενδοαγγειακές παρεμβάσεις.....	18
Διαχείριση των παραγόντων κινδύνου για ΤΙΑ	18
Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9).....	23
Γενικά.....	23
Μηχανισμός ρύθμισης των επιπέδων της ενδοκυττάριας χοληστερόλης.....	23

Ο LDL υποδοχέας	23
Ο ρόλος της πρωτεΐνης PCSK9 στο μεταβολισμό των λιπιδίων.	24
Η βιοχημεία της πρωτεΐνης PCSK9 – σύνθεση και ωρίμανση.	25
Πρωτεΐνη PCSK9 που έχει καταλυθεί από το ένζυμο Furin.....	28
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	31
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
Ο πληθυσμός της μελέτης	31
Μέθοδοι.....	33
Υλικά και όργανα της πειραματικής διαδικασίας	34
Αρχή της μεθόδου Quantikine ELISA Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 Immunoassay. ...	36
Πειραματική πορεία	36
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
Ανθρωπομετρικές παράμετροι.....	42
Δημογραφικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.....	42
Πολύπαραγοντική ανάλυση και μονοπαραγοντική ανάλυση.....	43
Scatter διαγράμματα διαμεταβλητών συσχετίσεων (Bivariate Correlations) στον πληθυσμό των ασθενών με TIA των συγκεντρώσεων της PCSK9 με άλλες κλινικοεργαστηριακές μεταβλητές. 47	
Scatter διάγραμμα της διαμεταβλητής συσχέτισης (Bivariate Correlation) στην ομάδα ελέγχου των συγκεντρώσεων της PCSK9 με την HDL.	50
Τελικές εκβάσεις στους 6 μήνες μετά το συμβάν	51
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	55
ABSTRACT.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο «Ιατρική Χημεία» του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Εκπονήθηκε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων κατά τη χρονική περίοδο 2017-2018, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Χαράλαμπου Μηλιώνη και των επιβλεπόντων καθηγητών κ. Αλέξανδρου Τσελέπη και κ. Γεώργιου Λιάμη.

Πρόκειται για μία πιλοτική μελέτη ασθενών-μαρτύρων διερεύνησης του ρόλου της πρωτεΐνης PCSK9 στα παροδικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια μη καρδιοεμβολικής αιτιολογίας και χαρακτηρίζεται από ερευνητική καινοτομία.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Παθολογίας κ. Χαράλαμφο Μηλιώνη για την πρωτότυπη ιδέα αυτής της Μεταπτυχιακής Διατριβής, τις γόνιμες παρατηρήσεις και τον ουσιαστική συμμετοχή του στην ερευνητική διαδικασία. Εν συνεχεία, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, ιδρυτή και πρόεδρο του παρόντος διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος μέσα από το οποίο μου δόθηκε η δυνατότητα να εκπονήσω αυτή τη διατριβή. Επιπλέον ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας κ. Γεώργιο Λιάμη, για την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της μετεκπαίδευσής μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Μωυσή Ελισάφ για την δυνατότητα μετεκπαίδευσής μου στο ιατρείο διαταραχών του μεταβολισμού των λιπιδίων του ΠΓΝΙ και την προτροπή του να συμμετάσχω σε αυτό το διατμηματικό μεταπτυχιακό, που διεύρυνε τους επιστημονικούς αλλά και τους προσωπικούς μου ορίζοντες.

Ευχαριστώ θερμά επίσης για τη βοήθειά τους: τον κύριο Τέλλη Κωνσταντίνο, λέκτορα βιοχημείας του τμήματος Χημείας, τη Χριστίνα Κωσταρά του τμήματος Ιατρικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής, καθώς και τους συμφοιτητές μου Ελένη Παππά, Σεμπάστιαν Φίλιππα Ντε Κουάν και Παπακώστα Κωνσταντίνα.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλο το προσωπικό του Εξωτερικού Ιατρείου Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Γενικό Μέρος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κλασικός ορισμός του παροδικού ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου (Transient Ischemic Attack, TIA) είναι η αιφνίδια εγκατάσταση ενός εστιακού νευρολογικού ελλείμματος αγγειακής αιτιολογίας που διαρκεί λιγότερο από 24 ώρες και αφορά συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου ή του οφθαλμού που αρδεύεται από συγκεκριμένη αρτηρία [1]. Ο πιο πρόσφατη ιστική θεώρηση του ορισμού των TIA τα περιγράφει ως παροδικά επεισόδια νευρολογικής δυσλειτουργίας που οφείλονται σε εστιακή ισχαιμική βλάβη του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού ή του αμφιβληστροειδή η οποία όμως δεν οδηγεί σε οξύ έμφρακτο [2].

Το TIA είναι ένα σοβαρό αγγειακό σύμβαμα, διότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση ενός καρδιαγγειακού συμβάματος ή ενός βαρύτερου ή και θανατηφόρου αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ) στις εβδομάδες ή τους μήνες μετά από το συμβάν [3-5]. Οι ασθενείς με TIA αθηροσκληρωτικής, μη καρδιοεμβολικής αιτιολογίας έχουν συχνά πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακών νοσημάτων [6]. Η πρώιμη αναγνώριση και τροποποίηση αυτών των προδιαθεσικών παραγόντων μειώνουν αποτελεσματικά τον κίνδυνο για υποτροπή του TIA ή την εγκατάσταση μόνιμου αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ) [7]. Προσφάτως δημοσιεύθηκε ότι η επείγουσα εκτίμηση και αντιμετώπιση των ασθενών με TIA μειώνει τον ετήσιο κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα στο 6.2% [8]. Λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι τα TIA αποτελούν μια κατάσταση υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου, θα ήταν ωφέλιμη η εφαρμογή και άλλων πιο επίκαιρων μέτρων δευτερογενούς πρόληψης.

Η proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) είναι μια πρωτεάση σερίνης που παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης και σχετίζεται

ιδιαίτερα με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων [9]. Συνδέεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL receptor) και προάγει την αποδόμησή του στα λυσοσώματα των ηπατοκυττάρων. Με αυτό τον τρόπο λιγότεροι LDL υποδοχείς παραμένουν διαθέσιμοι στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων για την απομάκρυνση της LDL χοληστερόλης από την κυκλοφορία [9, 10]. Αυξημένα επίπεδα PCSK9 εμφανίζουν οι ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα [11]. Επίσης νεότερα δεδομένα συσχετίζουν την PCSK9 με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κατά τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η αναστολή της PCSK9 μειώνει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σε ασθενείς με νοσήματα των αγγείων, συμπεριλαμβανομένων και των ΑΕΕ [12]. Ωστόσο δεν υπάρχουν ενδείξεις όσον αφορά στη συσχέτιση της PCSK9 με τα ΤΙΑ, θα μπορούσαν σχετικές επιβεβαιωτικές ενδείξεις να προτείνουν την PCSK9 ως ένα καινοτόμο στόχο για τη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με ΤΙΑ;

ΠΑΡΟΔΙΚΟ ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ (ΤΙΑ)

Τα ισχαιμικά παροδικά και τα εγκατεστημένα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια δημιουργούνται από τους ίδιους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς. Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός που τα χαρακτηρίζει είναι η ισχαιμία η οποία ορίζεται ως η ελάττωση της κυκλοφορίας του αίματος σε κάποια περιοχή του εγκεφάλου που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της οξυγόνωσης και της θρέψης των νευρώνων. Το γεγονός αυτό οδηγεί αιφνιδίως σε δυσλειτουργία των νευρώνων αυτών ως αποτέλεσμα της μείωσης παροχής υποστρώματος θρέψης, δηλαδή οξυγόνου και γλυκόζης.

Τα παροδικά Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια (ΤΙΑ) σε αντίθεση από τα εγκατεστημένα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΑΕΕ) χαρακτηρίζονται από εστιακά ισχαιμικά εγκεφαλικά νευρολογικά ελλείμματα που διαρκούν λιγότερο από 24 ώρες (συνήθως λιγότερο από 1 έως 2 ώρες). Στις μέρες μας λόγω της χρήσης της αξονικής (CT) και μαγνητικής τομογραφίας (MRI) στο ένα τρίτο από αυτά τα ΤΙΑ απεικονίζεται ισχαιμικό έμφρακτο [13].

Περίπου το 30% των ασθενών με παροδικό εγκεφαλικό επεισόδιο έχουν προηγούμενο ιστορικό ΤΙΑ και το 5 - 10% των ασθενών με πρωτοεμφανιζόμενο ΤΙΑ θα εμφανίσουν μόνιμο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) στις επόμενες 7 ημέρες (1-2%) και ή στον επόμενο μήνα(2-4%) [14, 15]. Το προγνωστικό score ABCD(2) [8] φαίνεται να εκτιμά αρκετά καλά τον κίνδυνο εμφάνισης νέου ΑΕΕ για τις επόμενες 2, 7 και 90 ημέρες αντίστοιχα λαμβάνοντας υπόψιν κλινικές πληροφορίες όπως: η παρουσία ημιπληγίας (2 βαθμοί), ή δυσαρθρίας χωρίς ημιπληγία (1 βαθμός); τη διάρκεια του επεισοδίου ≥ 60 min (2 βαθμοί) ή 10-59 min (1 βαθμός); και την ύπαρξη διαβήτη (1 βαθμός).

Αιτιολογία

Η πιο σημαντική αιτία της παροδικής εγκεφαλικής ισχαιμίας είναι η εμβολιασμός από θρόμβους. Σε πολλούς ασθενείς με ΤΙΑ, η αιτία είναι συχνά στην καρδιά (συνήθως στις αριστερές καρδιακές κοιλότητες) ή σε μια μεγάλη εξωκράνια αρτηρία του τραχήλου (αρτηριοαρτηριακής προέλευσης έμβολο). Ο εμβολικός χαρακτήρας αυτών των επεισοδίων από τις μεγάλες εξωκράνιες αρτηρίες όπως οι καρωτίδες εξηγεί γιατί στα ΤΙΑ επηρεάζονται διαφορετικά τμήματα του εγκεφάλου παρόλο που αρδεύονται από την ίδια μεγάλη αρτηρία [16]. Στην πρόσθια κυκλοφορία, οι αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις συμβαίνουν συχνότερα στην περιοχή του διχασμού των καρωτίδων και συχνά είναι ακουστές ως φύσημα. Η αθηροσκλήρωση επηρεάζει επίσης το σπονδυλοβασικό σύστημα καθώς και τα κυρία ενδοκράνια αγγεία δηλαδή τις μέσες και πρόσθιες εγκεφαλικές αρτηρίες. Η αθηροσκλήρωση του αορτικού τόξου μπορεί επίσης να αποτελέσει εστία αποκόλλησης θρόμβων.

Άλλα αίτια εμβολικής ισχαιμίας του εγκεφάλου που αποτέλεσαν και κριτήρια αποκλεισμού στον πληθυσμό της μελέτης αυτής, αποτελούν η κολπική μαρμαρυγή, η σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια, η λοιμώδης και μη ενδοκαρδίτιδα, το μύξωμα του αριστερού κόλπου, και οι τοιχωματικοί θρόμβοι μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Επίσης τα ελλείμματα του διαφράγματος των κόλπων και τα μεσοκολπικά ελλείμματα μπορούν να επιτρέψουν σε φλεβικά έμβολα να φτάσουν στον εγκέφαλο (παράδοξος εμβολισμός).

Λιγότερο συνηθισμένες ανωμαλίες των αρτηριών που μπορεί να προκαλέσουν ΤΙΑ περιλαμβάνουν την ινομυϊκή δυσπλασία, η οποία επηρεάζει ιδιαίτερα την αυχενική μοίρα της έσω καρωτιδικής αρτηρίας, οι φλεγμονώδεις αρτηριακές διαταραχές όπως η γιγαντοκυτταρική αρτηρίτιδα, η πολυαρτηρίτιδα και η κοκκιωματώδη αγγειίτιδα, καθώς και η μηνιγγιδοαγγειακή σύφιλη. Όπως είναι φυσικό επίσης αυτές οι σπάνιες διαταραχές των

αρτηριών δεν εμπλέκονται στην αθηρωματική διαδικασία και παθοφυσιολογικά δε θα μπορούσαν να συνδεθούν με αυξημένα επίπεδα της PCSK9.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η υπόταση (TIA εξαιτίας αιμοδυναμικής κρίσης) είναι σημαντική αιτία πρόκλησης παροδικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Κάθε συμβάν που προκαλεί απότομη πτώση της αρτηριακής πίεσης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της εγκεφαλικής ροής και συνεπώς σε μείωση της εγκεφαλικής αιμάτωσης. Οι θέσεις που προσβάλλονται εντοπίζονται στα πέρασ της περιοχής της αρτηριακής άρδευσης (μεθόρια ζώνη). Οι ασθενείς με συστολική αρτηριακή πίεση SBP<90 mmHg αποκλείστηκαν από την παρούσα μελέτη για αυτόν το λόγο.

Άλλα αίτια που επίσης δεν αφορούν την παρούσα μελέτη αλλά είναι σπάνια αίτια TIA είναι τα αιματολογικά αίτια όπως η πολυκυτταραιμία, η δρεπανοκυτταρική νόσος, τα σύνδρομα υπεργλοιοτότητας και το αντιφωσφολιπιδαιμικό σύνδρομο. Επίσης η σοβαρή αναιμία μπορεί επίσης να οδηγήσει σε νευρολογικά ελλείμματα σε ασθενείς με προηγούμενο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο λόγω μειωμένης προσφοράς οξυγόνου σε κάποια περιοχή του εγκεφάλου με προ υπάρχουσα διαταραχή της κυκλοφορίας. Τέλος το σύνδρομο υποκλοπής της υποκλειδίου αρτηρίας μπορεί να οδηγήσει σε ισχαιμία του σπονδυλοβασικού συστήματος και να οδηγήσει σε παροδικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.

Η φυσική ιστορία των TIA

Μερικοί ασθενείς εμφανίζουν σοβαρό μόνιμο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο μετά από μερικά επεισόδια TIA ενώ άλλοι ασθενείς μπορεί να συνεχίσουν να εμφανίζουν TIA χωρίς να εγκαταστήσουν μόνιμο εγκεφαλικό επεισόδιο. Ο κίνδυνος ΑΕΕ είναι υψηλός τους πρώτους 3

μήνες μετά το TIA και ιδιαίτερα το πρώτο 48ωρο και στη συνέχεια τον πρώτο μήνα. Τα επεισόδια μπορεί να συνεχίσουν αδιαλείπτως για πολύ καιρό ή να σταματήσουν αυτόματα. Γενικά τα καρωτιδικής αιτιολογίας TIA μπορεί να συσχετιστούν περισσότερο με μόνιμα ΑΕΕ και κυρίως σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 60 ετών, σε ασθενείς με διαβήτη ή σε ασθενείς με TIA που διαρκούν περισσότερο από 10 λεπτά.

Κλινική Εικόνα

Η κλινική εικόνα ποικίλει σημαντικά μεταξύ των ασθενών αλλά τα συμπτώματα σε ένα συγκεκριμένο ασθενή μπορεί να είναι πάντα τα ίδια όταν υποστεί δεύτερο επεισόδιο[17]. Η έναρξη είναι οξεία και χωρίς πρόδρομα συμπτώματα, ενώ η αποκατάσταση είναι επίσης αρκετά γρήγορη και συμβαίνει συνήθως μέσα σε λίγα λεπτά. Η σημειολογία εξαρτάται από την αρτηριακή κατανομή του εγκεφάλου που εμφανίζει την ισχαιμία και περιγράφεται παρακάτω.

Ισχαιμικά σύνδρομα

Τα έμβολα της έσω καρωτίδας που εμβολίζονται στην οφθαλμική αρτηρία μπορεί να εμφανιστούν με παροδική αμαύρωση (amaurosis fugax) δηλαδή με παροδική μονόφθαλμη τύφλωση.

Τα έμβολα που εμβολίζονται στην πρόσθια εγκεφαλική αρτηρίας εμφανίζονται με ετερόπλευρη ημιπληγία που είναι πιο έντονη στο κάτω άκρο από ότι στο σύστοιχο άνω άκρο, με αβουλία, και εμφάνιση αρχέγονων αντανακλαστικών.

Τα έμβολα της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας εμφανίζονται με ημιπληγία που είναι χειρότερη στο πρόσωπο και το άνω άκρο και λιγότερη στο ημιπληγικό κάτω άκρο, ημιαναισθησία, ομώνυμη ημιανοψία, αφασία αν αφορά το επικρατούν ημισφαίριο, απραξία και αμέλεια αν αφορούν το μη επικρατούν ημισφαίριο.

Τα έμβολα της οπίσθιας εγκεφαλικής αρτηρίας προκαλούν ομώνυμη ημιανοψία που σέβεται το οπτικό πεδίο της ωχράς κηλίδας, αλεξία με ή χωρίς αγραφία, θαλαμικό σύνδρομο με ετερόπλευρες ημιαναισθητικές διαταραχές.

Τα έμβολα του σπονδυλοβασικού συστήματος δίνουν γένεση στο σύνδρομο Wallenberg στο οποίο υπάρχει υπαισθησία ομόπλευρα στο πρόσωπο και ετερόπλευρα στα άκρα, ημιπληγία, διπλωπία, δυσαρθρία, λόξιγκας και ομόπλευρο σύνδρομο Horner.

Η ισχαιμία από τη βασική αρτηρία εμφανίζεται με διαταραχές στη διάμετρο της κόρης των οφθαλμών(διαστολή σε βλάβη του μεσεγκέφαλου, συστολή στη γέφυρα), τετραπληγία, υπαισθησία, διαταραχές στην παρεγκεφαλίδα ή το λεγόμενο σύνδρομο locked in που αφορά συνήθως εγκατεστημένα ΑΕΕ.

Κλίμακες Βαρύτητας και πρόβλεψης

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κλίμακες βαρύτητας για κλινικές δοκιμές εγκεφαλικού επεισοδίου είναι η mRS και η NIHSS. Η τροποποιημένη κλίμακα Rankin (mRS) εκτιμά σε άτομα που έχουν υποστεί εγκεφαλικό επεισόδιο το βαθμό αναπηρίας ή την ικανότητα του πάσχοντος να διενεργεί καθημερινές δραστηριότητες. Η κλίμακα περιεγράφηκε αρχικά το 1957 από τον John Rankin του Νοσοκομείου Stobhill στη Γλασκόβη της Σκωτίας και μετέπειτα τροποποιήθηκε στη σημερινή μορφή του από τον καθηγητή C. Warlow στο Δυτικό Γενικό Νοσοκομείο του Εδιμβούργου [18].

Η κλίμακα εγκεφαλικών του εθνικού Ινστιτούτου υγείας NIH (NIHSS) χρησιμοποιείται για την αντικειμενική ποσοτικοποίησή της βαρύτητας της βλάβης που προκαλείται από ένα εγκεφαλικό επεισόδιο. Το NIHSS αποτελείται από 11 στοιχεία, καθένα από τα οποία βαθμολογεί μια συγκεκριμένη ικανότητα μεταξύ 0 και 4 [19].

Το ABCD² αντίθετα είναι μια κλίμακα πρόβλεψης που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του κινδύνου να εμφανιστεί εγκεφαλικό επεισόδιο στις επόμενες ημέρες μετά από ένα παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο (TIA). Η βαθμολογία ABCD² βασίζεται σε πέντε παραμέτρους (ηλικία, αρτηριακή πίεση, κλινικά χαρακτηριστικά, διάρκεια TIA και παρουσία διαβήτη). Οι βαθμολογίες για κάθε στοιχείο προστίθενται και το συνολικό αποτέλεσμα κυμαίνεται μεταξύ μηδέν και επτά [20].

Απεικονιστικές Μέθοδοι με CT ή MRI

Ο έλεγχος με απεικονιστικές μεθόδους του εγκεφάλου είναι σημαντικό να γίνεται εντός 20 λεπτών από την άφιξη του ασθενή στο νοσοκομείο διότι, πέρα από τη δυνατότητα διάκρισης του εγκεφαλικού σε ισχαιμικό ή αιμορραγικό, καθορίζει και τη θεραπεία που θα ακολουθήσει ο ασθενής και κατ' επέκταση την έκβαση [21]. Παρόλο που η μαγνητική τομογραφία διάχυσης (DW-MRI) είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος στην οξεία ισχαιμία, η χρήση της δεν είναι πάντα άμεσα διαθέσιμη, ο ασθενής δε μπορεί να υποβληθεί πάντοτε σε αυτή διότι υπάρχουν περιορισμοί και επιπλέον δεν δικαιολογείται πάντα το κόστος. Συχνά η εξέταση αυτή αντενδείκνυται όπως σε ασθενείς με βηματοδότη, clips μετά από επέμβαση σε ανεύρυσμα εγκεφάλου, μεταλλικές καρδιακές βαλβίδες, μεταλλικά θραύσματα στους οφθαλμούς, μεταλλικές οστικές προθέσεις, κλειστοφοβία, διεγερτικός ασθενής, πιθανότητα εμετού και εισρόφησης κατά την εξέταση. Επομένως όλοι οι άλλοι ασθενείς πρέπει να υποβάλλονται σε

αξονική τομογραφία χωρίς τη χρήση σκιαγραφικού (NCCT) [\[13\]](#) και η DW-MRI να γίνεται μόνο όταν είναι δυνατόν να διενεργηθεί.

Απεικόνιση των αγγείων του τραχήλου

Η απεικόνιση του συστήματος των καρωτίδων για την ανίχνευση στενώσεων είναι αναγκαίο να γίνει είτε με υπερηχογράφημα duplex είτε με CT ή MRI αγγειογραφία που επιτρέπουν ευρύτερη απεικόνιση του συστήματος της εξωκράνιας και ενδοκράνιας κυκλοφορίας. Επιπρόσθετα ο συνδυασμός αυτών των μεθόδων με το ABCD² score μπορεί να προσδιορίσει εκείνα τα άτομα που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εγκατάστασης ενός μόνιμου ΑΕΕ [\[22\]](#).

Εργαστηριακές δοκιμασίες και άλλα

Στους ασθενείς με ΤΙΑ πρέπει να μετράτε η αρτηριακή πίεση, και να γίνονται εργαστηριακά αίματος συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζη νηστείας και του λιπιδαιμικού προφίλ. Πάντοτε πρέπει να γίνεται ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ) και να λαμβάνονται καλλιέργειες αίματος εάν υπάρχει η πιθανότητα ενδοκαρδίτιδας. Οι ασθενείς με ΤΙΑ πρέπει να υποβάλλονται σε εξέταση με Holter ρυθμού για τη διάγνωση της παροξυσμικής κολπικής μαρμαρυγής [\[23\]](#). Φαίνεται ότι μετά από κρυπτογενή ΑΕΕ ή παροδικά ισχαιμικά επεισόδια στο 14-16% ανιχνεύεται παροξυσμική κολπική μαρμαρυγή [\[24, 25\]](#).

Εισαγωγή στο νοσοκομείο

Εισαγωγή πρέπει να γίνεται σε ασθενείς με ΤΙΑ που εμφανίστηκε σε ένα διάστημα λιγότερο από μια εβδομάδα όταν έχουν αυξημένο κίνδυνο για υποτροπή. Οι ασθενείς που έχουν

αυξημένο κίνδυνο είναι συνήθως ασθενείς με score ABCD² μεγαλύτερο από 4 [26]. Εισαγωγή επίσης απαιτείται και σε ασθενείς με TIA και πολλαπλά πρόσφατα επεισόδια TIA (δύο ή περισσότερα σε μία εβδομάδα -crescendo TIA), με συμπτωματική καρωτιδική στένωση, ή γνωστή αιτία καρδιακών εμβόλων ή γνωστή υπερπηκτική κατάσταση, για τη θεραπεία και την έναρξη μέτρων δευτερογενούς πρόληψης. Κατά την εισαγωγή θα πρέπει επίσης να γίνεται σε όλους τους ασθενείς έλεγχος κατάποσης πριν χορηγηθεί οποιαδήποτε τροφή ή υγρά από το στόμα για αποφυγή πνευμονίας από εισρόφηση.

Θεραπεία

Η άμεση έναρξη αγωγής σε ασθενείς με TIA μειώνει τα ποσοστά των επακόλουθων εγκεφαλικών επεισοδίων και η κατάσταση αυτή θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με παρόμοια αίσθηση του επείγοντος όπως η ασταθής στηθάγχη. Η διαχείριση των παραγόντων κινδύνου για επανεμφάνιση ενός TIA ή ενός μόνιμου ΑΕΕ είναι ουσιαστικής σημασίας και περιγράφεται παρακάτω. Η αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη, της υπέρτασης κατά προτίμηση με ένα αντιυπερτασικό του άξονα, η έναρξη μιας στατίνης με μια δόση που μπορεί να επιφέρει μείωση της LDL-C 50% ή να επιτύχει επίπεδα <70mg/dl, η διακοπή του καπνίσματος, τα υγιεινοδιαιτητικά μέτρα είναι πρωταρχικής σημασίας στην προσέγγιση αυτών των ασθενών.

Αντιπηκτικά

Η κύρια αιτία έναρξης αντιπηκτικών σε ασθενείς με TIA είναι η κολπική μαρμαρυγή καθώς και οι ασθενείς με μεταλλικές καρδιακές βαλβίδες, με θρόμβους στον αριστερό κόλπο και με αντιφωσφολιπιδαιμικό σύνδρομο. Η θεραπεία με αντιπηκτικά σε αυτούς τους ασθενείς

μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης νέου ΑΕΕ στα δύο τρίτα [25]. Η θεραπεία με ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ πρέπει να έχει ως στόχο την επίτευξη χρόνου INR μεταξύ 2.0 και 3.0. Δεν είναι πάντοτε απαραίτητη η θεραπεία γέφυρας με ηπαρίνη μικρού μοριακού βάρους μέχρι την επίτευξη του θεραπευτικού χρόνου, ενώ προτείνεται επίσης και συχορήγηση των κουμαρινικών αντιπηκτικών με ηπαρίνη μέχρι την επίτευξη του θεραπευτικού χρόνου. Τα νεότερα από του στόματος αντιπηκτικά (dabigatran 150mg δύο φορές ημερησίως, rivaroxaban 15mg ή 20mg μία φορά ημερησίως και apixaban 2.5mg ή 5mg δύο φορές ημερησίως) επίσης έχουν θέση στη θεραπεία των ΤΙΑ από κολλική μαρμαρυγή μη βαλβιδικής αιτιολογίας, αλλά συχνά δε γίνεται έναρξη στην οξεία φάση, λόγω μη πρόσβασης του νοσοκομείου στα αντίδοτα, σε περίπτωση αιμορραγικής μετατροπής. Η συνδυαστική θεραπεία αντιπηκτικής και αντιαιμοπεταλιακής αγωγής ενδείκνυται μόνο σε ασθενείς με μηχανικές βαλβίδες ή με πρόσφατο stent στα στεφανιαία αγγεία. Ενώ το Rivaroxaban δεν ήταν ανώτερο από την ασπιρίνη όσον αφορά στην πρόληψη του υποτροπιάζοντος εγκεφαλικού επεισοδίου μετά από πρώτο εμβολικό εγκεφαλικό επεισόδιο απροσδιόριστης πηγής και συσχετίστηκε με υψηλότερο κίνδυνο αιμορραγίας [27].

Αντιαιμοπεταλιακά

Όλοι οι ασθενείς που δεν έχουν ένδειξη για αντιπηκτική αγωγή πρέπει να θεραπεύονται με αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα για να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης νέου ΑΕΕ. Η πρώιμη έναρξη θεραπείας μετά από ΤΙΑ σχετίζεται με 80% μείωση του κινδύνου για εμφάνιση νέου ΑΕΕ [28]. Η θεραπεία με ασπιρίνη σε δόση 160 ή 325mg θα πρέπει να αρχίσει το συντομότερο δυνατό [29-31]. Ο συνδυασμός ασπιρίνη και διπυριδαμόλης, και η μονοθεραπεία με κλοπιδογρέλη εμφανίζουν παρόμοια αποτελεσματικότητα [32]. Η

σιλοσταζόλη 100mg δύο φορές ημερησίως είχε την ίδια αποτελεσματικότητα σε ασιατικό πληθυσμό με λιγότερο κίνδυνο αιμορραγίας [17]. Η παρατεταμένη αγωγή με συνδυασμό ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης αυξάνει τον κίνδυνο αιμορραγίας, παρόλα αυτά μεσοπρόθεσμα μπορεί να πλεονεκτεί. Επίσης έχει γίνει σύγκριση της τιγαγρελόλης vs ασπιρίνης σε ασθενείς με TIA στην οποία δε φάνηκε να πλεονεκτεί η τιγαγρελόλη. Όμως στους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στην ασπιρίνη η τιγαγρελόλη φαίνεται να υπερτερεί [33].

Μια κινεζική μελέτη έδειξε ότι η έναρξη θεραπείας εντός 24 ωρών από την εμφάνιση του TIA με αρχική δόση κλοπιδογρέλης 300mg και στη συνέχεια 75mg για 90 ημέρες (σε συχορήγηση με ασπιρίνη 75mg για τις πρώτες 21 ημέρες) ήταν ποιο αποτελεσματική από την ασπιρίνη μόνη της στην μείωση του κινδύνου εμφάνισης νέου AEE [32].

Σε ασθενείς με μικρό ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ή παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο υψηλού κινδύνου (TIA), η θεραπεία με κλοπιδογρέλη συν ασπιρίνη αποτρέπει την υποτροπή των AEE, αλλά ο συνδυασμός προκαλεί επίσης περισσότερη αιμορραγία από ότι η ασπιρίνη μόνη της. Τα ευρήματα δημοσιεύθηκαν στο περιοδικό New England Journal of Medicine και παρουσιάστηκαν στο Ευρωπαϊκό Συνέδριο Οργάνων Εγκεφαλικού. Περίπου 5000 ασθενείς σε 10 χώρες τυχαιοποιήθηκαν, εντός 12 ωρών από TIA ή εγκεφαλικό επεισόδιο, σε κλοπιδογρέλη συν ασπιρίνη ή εικονικό φάρμακο συν ασπιρίνη για 90 ημέρες. Συνολικά, τα σημαντικά ισχαιμικά επεισόδια εμφανίστηκαν σημαντικά λιγότερο συχνά με την κλοπιδογρέλη μαζί με την ασπιρίνη από ό,τι μόνο με την ασπιρίνη (5,0% έναντι 6,5%). Εάν χρησιμοποιείται διπλή θεραπεία, θα πρέπει να περιορίζεται στις πρώτες 3 εβδομάδες μετά από ένα TIA ή εγκεφαλικό επεισόδιο και στη συνέχεια να μετατραπεί σε μονοθεραπεία [34].

Ενδοαγγειακές παρεμβάσεις

Στις στενώσεις που καταλαμβάνουν το 70-90% του αυλού σε καρωτίδες αρτηρίες που ευθύνονται για το TIA μπορεί να γίνει ενδαρτηρεκτομή ή αγγειοπλαστική όταν ο περιεπεμβατικός κίνδυνος είναι μικρότερος από 6%. Αντίθετα οι ασθενείς με στενώσεις 50-69% έχουν μέτριο όφελος από τέτοιου είδους παρεμβάσεις. Η ενδαρτηρεκτομή δεν ενδείκνυται για στενώσεις μικρότερες από 50%.

Διαχείριση των παραγόντων κινδύνου για TIA

Υπέρταση:

Περίπου το 70% των ασθενών με ισχαιμικά ΑΕΕ είναι υπερτασικοί ασθενείς, δηλαδή εμφανίζουν συστολική αρτηριακή πίεση (SBP) $SBP \geq 140$ mmHg και διαστολική αρτηριακή πίεση (DBP) $DBP \geq 90$ mmHg στο ιατρείο. Η διόρθωση της υπέρτασης με ένα αντιυπερτασικό του άξονα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης είναι η πιο σημαντική παρέμβαση που μπορεί να γίνει για τη δευτερογενή πρόληψη των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων [35]. Η θεραπεία της υπέρτασης μείωσε την εμφάνιση των TIA σε διάφορες μελέτες και σε μετααναλύσεις [13]. Λίγα είναι τα δεδομένα για τις βέλτιστες τιμές της αρτηριακής πίεσης για τη δευτερογενή πρόληψη των TIA. Μάλιστα σε διαβητικούς ασθενείς δεν υπάρχει επιπλέον όφελος από τη διατήρηση της συστολικής πίεσης $SBP < 120$ mmHg vs. $SBP < 140$ mmHg. Επίσης δε γνωρίζουμε το όφελος από την έναρξη αγωγής σε ασθενείς με συστολική πίεση < 140 mmHg και διαστολική < 90 mmHg (Class IIb, LOE C). Ωστόσο υπάρχουν αναφορές για διατήρηση της συστολικής πίεσης < 130 mmHg [36]. Παρομοίως, οι ασθενείς που έλαβαν εξιτήριο με $SBP < 120$ mmHg είχαν αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε σύγκριση με όσους εξήλθαν με SBP μεταξύ 120-140 mmHg [37].

Δυσλιπιδαιμία:

Οι στατίνες έχουν σημαντική θέση στη δευτερογενή πρόληψη των αθηροσκληρωτικής αιτιολογίας TIA [38, 39]. Η επίτευξη επιπέδων LDL-C < 70 mmHg σχετίζεται με 28% μείωση του κινδύνου για νέο AEE χωρίς να αυξάνει τον κίνδυνο για αιμορραγικό AEE στις post-hoc αναλύσεις. Επίσης οι ασθενείς με TIA ή AEE που πετυχαίνουν μειώσεις $\geq 50\%$ των επιπέδων της LDL-C εμφανίζουν 35% μείωση στο συνδυασμένο κίνδυνο για μη-θανατηφόρα και θανατηφόρα AEE. Στους ασθενείς που έχουν επιτύχει τους στόχους των επιπέδων της LDL-C, τα αυξημένα τριγλυκερίδια σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ισχαιμικά AEE και TIA από μεγάλες αθηροσκληρωτικές αρτηρίες. Επίσης τα αυξημένα επίπεδα απολιποπρωτεΐνης (a) LP(a) σχετίζονται επίσης με αυξημένο κίνδυνο για ισχαιμικά AEE και TIA. Η σιμβαστατίνη μάλλον δεν πρέπει να χρησιμοποιείται στα TIA διότι απέτυχε να δείξει όφελος σε ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο μαζί με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη και παρακολούθηθηκαν για 90 ημέρες [40]. Η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της PCSK9 φαίνεται να έχει θέση στην πρόληψη των AEE που υπό μέγιστη δόση ατορβαστατίνης και εζετιμίμπης που δεν πετυχαίνουν τους στόχους της υπολιπιδαιμικής αγωγής. Στη μελέτη Fourier φάνηκε η enocumab να μειώνει κατά 21 έως 27% τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου, εγκεφαλικού επεισοδίου και στεφανιαίας επαναγγείωσης [30]. Στην ODYSSEY σε μια περίοδο 78 εβδομάδων, το alirocumab, όταν προστέθηκε στη θεραπεία με στατίνη στη μέγιστη ανεκτή δόση, μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και υπάρχουν ενδείξεις για μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων συμπεριλαμβανομένων και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων με alirocumab [41].

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I και II:

Στο δυτικό πληθυσμό το 11.3% εμφανίζει σακχαρώδη διαβήτη ή προδιαβήτη. Ο σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση του πρώτου ισχαιμικού ΑΕΕ (σχετικός κίνδυνος 1.5-3.7). Ο προδιαβήτης χαρακτηρίζεται από διαταραχή στην γλυκόζη νηστείας (IFG), από διαταραχή στην ανοχή γλυκόζης (IGT) και από αυξημένα επίπεδα HbA1c (5.7-6.4%). Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν μεγάλες μελέτες για τη δευτερογενή πρόληψη των ΤΙΑ σε ασθενείς με διαβήτη ή προδιαβήτη. Τα υγιεινοδιαιτητικά μέτρα είναι ποιο αποτελεσματικά από τη μετφορμίνη στη μελέτη Diabetes Prevention Program Trial. Σε όλους τους ασθενείς με διαβήτη φάνηκε όφελος όταν άρχισαν θεραπεία με στατίνες και μείωσαν τα επίπεδα της αρτηριακής τους πίεσης SBP<140 και DBP<90 mmHg.

Παχυσαρκία:

Όλοι οι ασθενείς με ΤΙΑ ή ΑΕΕ θα πρέπει να ελέγχονται για παχυσαρκία μετρώντας το δείκτη μάζας σώματος BMI (class I level C). Δεν γνωρίζουμε το όφελος από την απώλεια βάρους όσον αφορά στην μείωση της επίπτωσης των ΤΙΑ (class IIb, level C)

Μεταβολικό Σύνδρομο:

Το μεταβολικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από την συνύπαρξη διαταραχών που αυξάνουν τον κίνδυνο για αγγειακά νοσήματα όπως η παχυσαρκία, η υπερτριγλυκεριδαιμία, η χαμηλή HDL-C, η υψηλή αρτηριακή πίεση και η υπεργλυκαιμία. Η τρέχουσα βιβλιογραφία περιλαμβάνει ως χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου και την υποκλινική φλεγμονή, τις διαταραχές της θρόμβωσης και της ινοδόλυσης και τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου [21]. Συνήθως για να χαρακτηριστεί ένας ασθενής ότι έχει μεταβολικό σύνδρομο απαιτούνται τρία από τα ακόλουθα κριτήρια, αυξημένη περίμετρο μέσης συγκεκριμένη για κάθε πληθυσμό,

τριγλυκερίδια πλάσματος $\geq 150\text{mg/dl}$, HDL-C $< 40\text{mg/dl}$ για τους άνδρες και $< 50\text{mg/dl}$ για τις γυναίκες, συστολική ΑΠ $\geq 130\text{mmHg}$ και διαστολική ΑΠ $\geq 85\text{mmHg}$ και τιμές γλυκόζης νηστείας πλάσματος $\geq 100\text{mg/dl}$. Το 30-50% των ασθενών με ισχαιμικά ΑΕΕ έχουν μεταβολικό σύνδρομο. Στους ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο πρέπει να προτείνονται υγιεινοδιαιτητικά μέτρα (δίαιτα, άσκηση, απώλεια βάρους) (class I level C) [21]. Επίσης είναι σημαντικό να παρεμβαίνουμε θεραπευτικά για τα στοιχεία εκείνα του μεταβολικού συνδρόμου όπως η υπέρταση και η δυσλιπιδαιμία που αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ (class I, level A) [21].

Απουσία σωματικής άσκησης:

Η σωματική άσκηση για 30 λεπτά άσκησης τουλάχιστον 5 ημέρες την εβδομάδα φαίνεται να βοηθάει στην απώλεια σωματικού βάρους και βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ [42].

Σύνδρομο Υπνικής Άπνοιας:

Στους ασθενείς με ΤΙΑ συνιστάται διεξαγωγή μελέτης ύπνου λόγω της πολύ υψηλής επίπτωσης του συνδρόμου υπνικής άπνοιας. (Class IIb, LOE B). Η θεραπεία με συνεχείς θετικές πιέσεις σε ασθενείς με αυτό το σύνδρομο και ΤΙΑ βελτιώνει την επιβίωση (Class IIb, LOE B) [43].

Κάπνισμα και Αλκοόλ:

Η έκθεση στον καπνό ακόμη και αν είναι έκθεση σε καπνό του περιβάλλοντος (παθητική έκθεση) αυξάνει τον κίνδυνο ΑΕΕ. Επομένως είναι επιτακτική η ανάγκη για διακοπή του

καπνίσματος (Class I; Level of Evidence C) και η σύσταση για αποφυγή της έκθεσης σε παθητικό κάπνισμα (Class IIa; Level of Evidence B)[13].

Η χαμηλή προς μέτρια κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης πρώτου εγκεφαλικού επεισοδίου (1 ποτό /ημέρα για τις γυναίκες και 2 ποτά/ημέρα για τους άνδρες). Ενώ η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο αιμορραγικών ΑΕΕ.

Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ PCSK9 (PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN KEXIN TYPE 9)

Γενικά

Από τότε που ανακαλύφθηκε η PCSK9 περίπου πριν μια δεκαετία, όταν έγινε η παρατήρηση ότι οι ασθενείς με gain of function μεταλλάξεις της PCSK9 έχουν υψηλές τιμές LDL χοληστερόλης και πάσχουν από οικογενή υπερχοληστερολαιμία, το ένζυμο αυτό βρέθηκε ότι εμπλέκεται σε διάφορα βιοχημικά μονοπάτια του μεταβολισμού των λιπιδίων, της φλεγμονής και της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στην αθηρωματική πλάκα και του μεταβολισμού της γλυκόζης.

Μηχανισμός ρύθμισης των επιπέδων της ενδοκυττάριας χοληστερόλης.

Ο LDL υποδοχέας

Υπάρχει ένας σπουδαίος μηχανισμός ρύθμισης της παραγωγής της ενδοκυττάριας χοληστερόλης σύμφωνα με τα ενδοκυττάρια επίπεδα χοληστερόλης. Έτσι, όταν τα ενδοκυττάρια επίπεδα χοληστερόλης είναι χαμηλά οι πρωτεΐνες SREB (Sterol Regulatory Elemental Binding Proteins) αυξάνονται στον πυρήνα των κυττάρων. Ουσιαστικά οι ρυθμιστικές αυτές πρωτεΐνες είναι μεταγραφικοί παράγοντες για την παραγωγή νέων υποδοχέων LDL έτσι ώστε να μπορέσουν να ενδοκυττώσουν αρκετά σωματίδια LDL και κατ' επέκταση να αυξηθούν τα επίπεδα χοληστερόλης μέσα στο κύτταρο που ήταν και ο μηχανισμός που πυροδότησε τη δημιουργία των LDL υποδοχέων. Έτσι στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών κυρίως των ηπατοκυττάρων, υπάρχουν ελεύθεροι LDL υποδοχείς που

δεσμεύουν τα κυκλοφορόντα στο εξωκυττάριο υγρό LDL σωματίδια. Ο LDL υποδοχέας μαζί με το σωματίο LDL ενδοκυττώνεται σε ένα ενδοσώμα περιβεβλημένο με κλαθρίνη η οποία ευοδώνει τη φαγοκυτταρική διαδικασία. Το περιβάλλον του ενδοσώματος έχει όξινο pH γεγονός που οδηγεί στη διάσπαση του LDL υποδοχέα από το LDL σωματίο. Με αυτό τον τρόπο ο LDL υποδοχέας απελευθερώνεται και μπορεί να επιστρέψει στην επιφάνεια του κυττάρου, ενώ το LDL σωματίο αποδομείται στα εξων συνετέθη έτσι ώστε το κύτταρο να χρησιμοποιήσει τη χοληστερόλη που περιέχει. Αυτός ο κύκλος διαρκεί 10-15 λεπτά της ώρας για να ολοκληρωθεί και μπορεί να επαναληφθεί 100-150 φορές. Αυτός είναι ο τρόπος που το κύτταρο ανακυκλώνει τον LDL υποδοχέα.

Ο ρόλος της πρωτεΐνης PCSK9 στο μεταβολισμό των λιπιδίων.

Όμως παράλληλα με τη μεταγραφή των γονιδίων για τον LDL υποδοχέα, τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης SREB μεταγράφεται και η πρωτεΐνη PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) που αποτελείται από 692 αμινοξέα [44]. Συνεπώς τόσο η PCSK9 όσο και ο LDL υποδοχέας αυξάνονται όταν τα ενδοκυττάρια επίπεδα χοληστερόλης μειωθούν.

Η ελεύθερη μοίρα των LDL υποδοχέων εκτός από τη θέση δέσμευσης που αλληλοεπιδρά με τις απολιποπρωτεΐνες B-100 των LDL σωματιδίων έχει και μία άλλη θέση (EGF-A περιοχή) που αλληλοεπιδρά με την PCSK9 [45]. Η πρωτεΐνη PCSK9 αλληλοεπιδρά άμεσα με το εξωκυττάριο τμήμα του LDL υποδοχέα, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα το οποίο ενδοκυτταρώνεται και αυτό δια μέσου ενδοσωμάτων επενδεδυμένων με κλαθρίνη.

Εντός του όξινου περιβάλλοντος των ενδοσωμάτων η συγγένεια της πρωτεΐνης PCSK9 και του LDL υποδοχέα αυξάνεται σημαντικά, εγκαθιστώντας μια πιο ισχυρή σύνδεση μεταξύ τους (κατά 150–170 φορές). Έτσι, η PCSK9 αποτρέπει την ανακύκλωση του LDL υποδοχέα στην

κυτταρική επιφάνεια, δίνοντας προτεραιότητα στη διάσπασή του από τις λυσοσωμιακές υδρολάσες. Επομένως, η παρουσία της πρωτεΐνης PCSK9 αυξάνει την αποδόμηση των LDL υποδοχέων, μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους στην επιφάνεια του ηπατοκυττάρου, με αποτέλεσμα μείωση της ηπατικής πρόσληψης της LDL-χοληστερόλης και αύξηση των επιπέδων της στο πλάσμα. Είναι πολύ σημαντικό στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι η PCSK9 δεν διασπά τον υποδοχέα με ενζυμικό τρόπο. Στο γενικό πληθυσμό, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης PCSK9 στο πλάσμα ποικίλλει και μάλιστα με μεγάλο εύρος τιμών, με τις γυναίκες ειδικά στην εμμηνόπαυση σε σύγκριση με τους άνδρες να έχουν πιο αυξημένα επίπεδα.

Η βιοχημεία της πρωτεΐνης PCSK9 – σύνθεση και ωρίμανση.

Η PCSK9 αρχικά ανακαλύφθηκε ως πρωτεΐνη που μεταγράφεται σε αποπτωτικούς εγκεφαλικούς νευρώνες και για αυτό το λόγο αρχικά ονομάστηκε NARC-1 (neural apoptosis regulated convertase-1) [46]. Η PCSK9 συντίθεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα, αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις εκφράζεται στο λεπτό έντερο, το νεφρό, το πάγκρεας, στα αγγεία και τον εγκέφαλο.

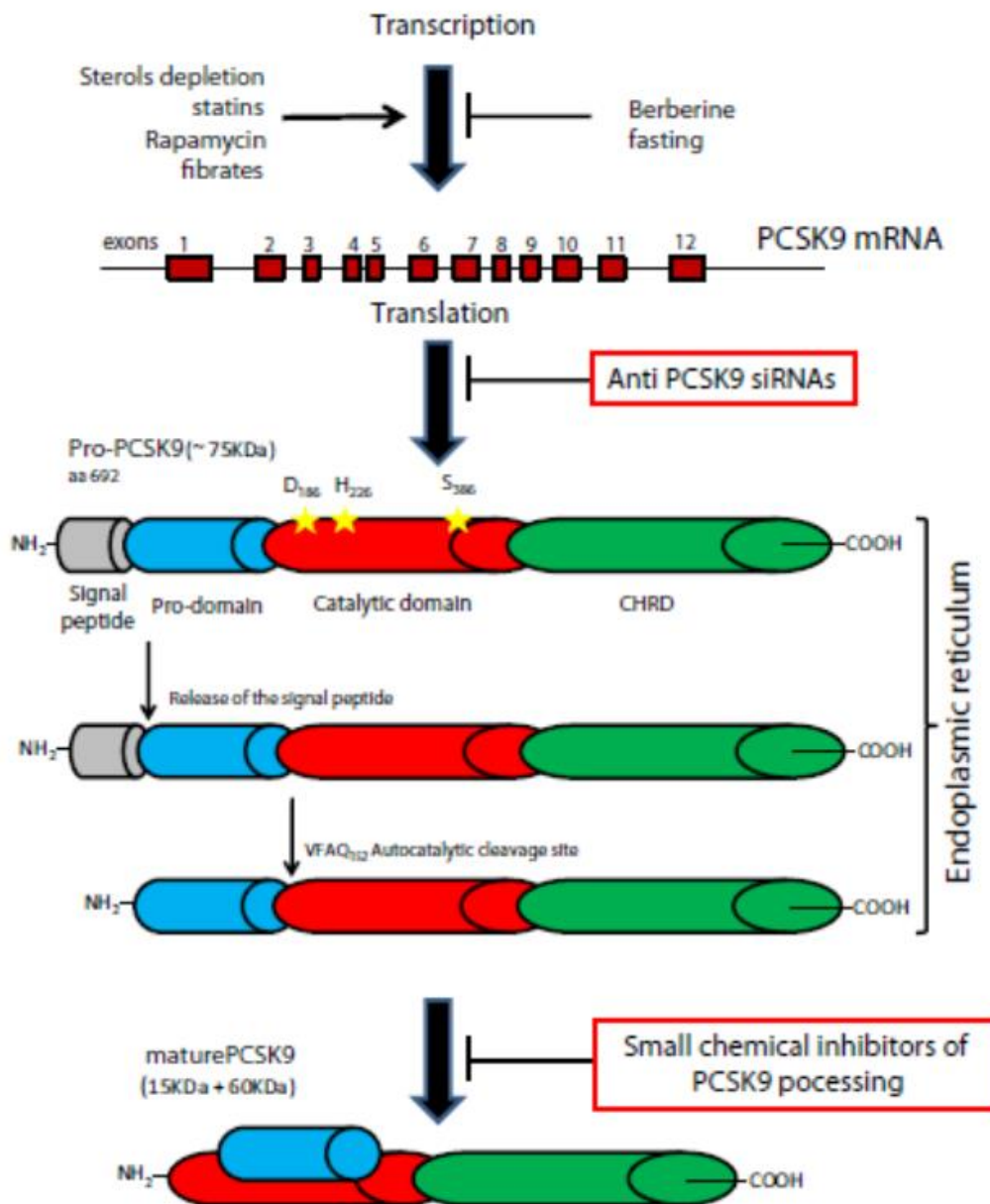
Η PCSK9 ανήκει σε μια ομάδα ενζύμων που απαρτίζεται από 9 μέλη. Τα πρώτα 8 ένζυμα περιλαμβάνουν τα ένζυμα PC1,2,3,5,7, το ένζυμο Furin, το PACE4 (paired basic Amino Acid Cleaving Enzyme-4) και τέλος το ισοένζυμο subtilisin kexin isozyme-1. Ο ρόλος τους είναι να διασπούν πρόδρομα μόρια πρωτεϊνών αυξητικών παραγόντων, ορμονών, υποδοχέων και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Σε αντίθεση το ένατο μέλος αυτής της ομάδας, η PCSK9, δεν έχει ενζυμική δραστηριότητα.

Η σύνθεση της PCSK9 αρχίζει από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 p32.3 [45]. Το mRNA που παράγεται έχει 12 εξώνια και μεταφέρει την πληροφορία για τη μεταγραφή

της πρωτεΐνης Pro-PCSK9. Όταν η Pro-PCSK9 (~75kDa) δημιουργείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο απαρτίζεται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, με περιοχή pro-domain, μια καταλυτική περιοχή, και ένα καρβοξυτελικό τμήμα. Το σηματοδοτικό πεπτίδιο είναι σημαντικό διότι οδηγεί την Pro-PCSK9 στη διαδρομή που πρέπει να ακολουθήσει στο ενδοπλασματικό δίκτυο (trafficking pathway). Κατά τη διαδρομή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο το σηματοδοτικό πεπτίδιο αποκόπτεται και σχηματίζεται μια ποιο ώριμη μορφή της πρωτεΐνης PCSK9. Η εναπομείνασα πρωτεΐνη PCSK9 στη συνέχεια συσκευάζεται στη συσκευή του Golgi και ακολουθεί μια θεαματική διαδικασία μετατροπής. Η περιοχή pro-domain αποκόπτεται και αντί να φύγει συνδέεται με την καταλυτική περιοχή του μορίου της PCSK9. Η διαδικασία αυτή αφαιρεί την ενζυμική ικανότητα από την PCSK9. Έτσι η PCSK9 ενώ έχει ενζυμική δραστηριότητα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, απενεργοποιείται στην συσκευή του Golgi.

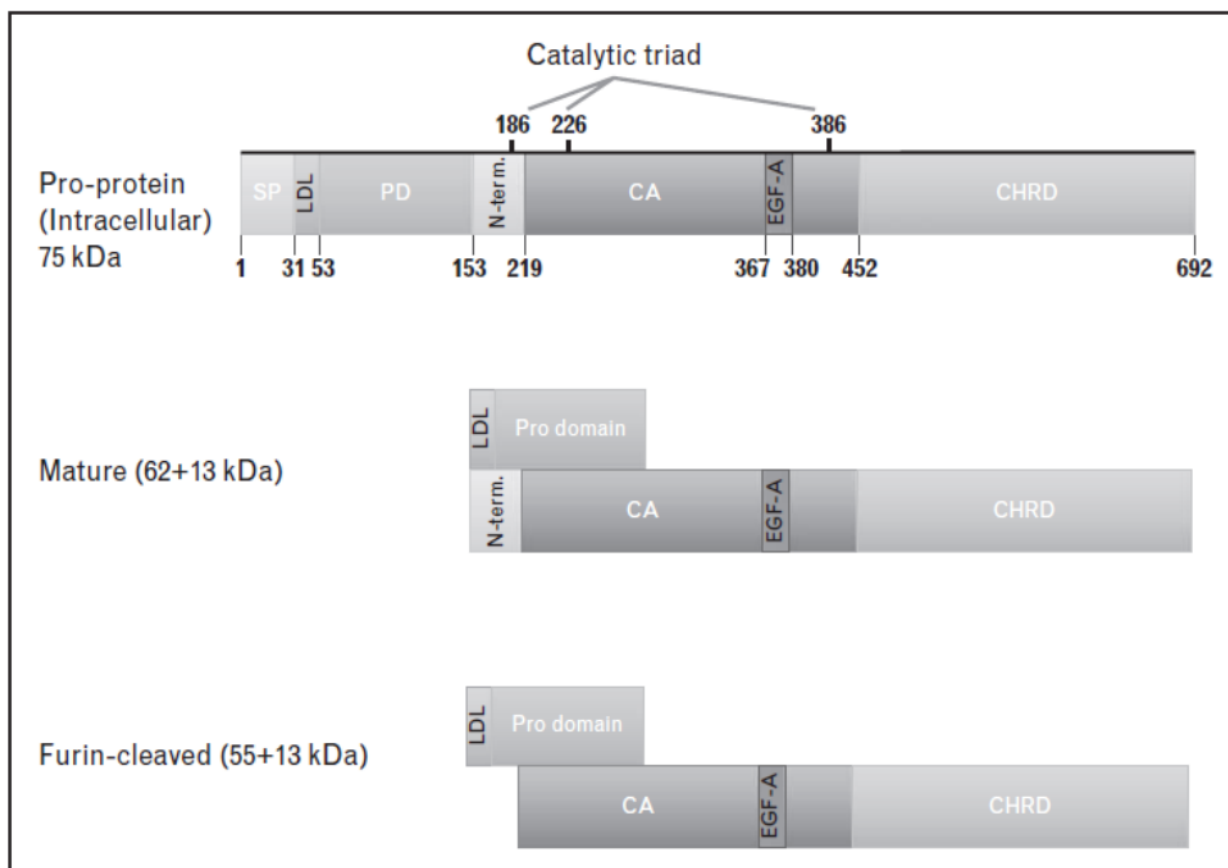
Όταν το σηματοδοτικό πεπτίδιο αποκόπτεται αποκαλύπτεται η θέση 31 έως 35 του N-τελικού άκρου της PCSK9 που μπορεί να συνδεθεί με την EGF-A περιοχή του LDL υποδοχέα. Επομένως δημιουργείται μια ώριμη πρωτεΐνη PCSK9 (62+13kDa) που μπορεί να αντιδράσει με τον LDL υποδοχέα.

PCSK9 gene Chromosome 1,p32.3



Πρωτεΐνη PCSK9 που έχει καταλυθεί από το ένζυμο Furin

Οι ώριμες πρωτεΐνες PCSK9 μπορεί να αλληλοεπιδράσουν με μια κονβερτάση που ονομάζεται Furin. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό μια τροποποιημένης πρωτεΐνης PCSK9 (55+13kDa) η οποία απελευθερώνεται και αυτή στον εξωκυττάριο χώρο. Έτσι ουσιαστικά τόσο η ώριμη όσο και η τροποποιημένη από την Furin πρωτεΐνη PCSK9 βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο. Η τροποποιημένη μορφή της PCSK9 από την furin όμως δεν μπορεί να συνδεθεί με τον LDL υποδοχέα [47].



Φλεγμονή και PCSK9:

Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η PCSK9 επάγεται έντονα από διάφορα φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως οι λιποπολυσακχαρίδες, zymosan και turpentine με αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της LDL χοληστερόλης [48]. Επίσης η χορήγηση PCSK9 αυξάνει την πρόσληψη της ox-LDL και της πρωτεΐνης προσκόλλησης στο ενδοθήλιο των αγγείων (VCAP-1) από τα λεία μυϊκά κύτταρα, γεγονός που αποτελεί κομβικό σημείο στον καταρράκτη που συνδέει τη συσσώρευση χοληστερόλης με τη χρόνια φλεγμονώδη διεργασία που ονομάζεται αθηροσκλήρωση [49]. Επιπρόσθετα, η χαμηλή δραστηριότητα της PCSK9 σχετίζεται με αυξημένη απομάκρυνση των παθογόνων μέσω του LDL υποδοχέα, χαμηλή φλεγμονώδη απόκριση και βελτιωμένη έκβαση στο σηπτικό shock.

Λιποπρωτεΐνη (a) και PCSK9:

Η λιποπρωτεΐνη (a) LP(a) σχετίζεται ανεξάρτητα με τα καρδιαγγειακά νοσήματα και δρα σαν προ-φλεγμονώδης μεσολαβητής στην αθηρωματική πλάκα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της PCSK9 φάνηκε ότι μειώνουν τα επίπεδα της LP(a) κατά 20% [50].

Υπέρταση και PCSK9:

Υπάρχουν λίγες αναφορές που αναφέρουν ότι η PCSK9 προάγει την αποδόμηση των επιθηλιακών καναλιών Na(+) που ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση μέσω επαναρόφησης νατρίου στα αθροιστικά σωληνάρια.(18), ενώ υπάρχει μελέτη που ισχυρίζεται ότι υπάρχει συσχέτιση των αυξημένων τιμών της PCSK9 με την αρτηριακή πίεση [51].

Χρόνια νεφρική νόσος και PCSK9:

Υπάρχουν λίγα δεδομένα σε αυτό τον τομέα. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε όμως ότι τα επίπεδα της PCSK9 σχετίζονται αρνητικά με την νεφρική λειτουργία (20). Μετά από μεταμόσχευση νεφρού ή αιμοκάθαρση η PCSK9 [52].

Ομοιοστασία της γλυκόζης και PCSK9:

Τα διαθέσιμα δεδομένα για τον άνθρωπο σχετικά με την επίδραση του PCSK9 στην ομοιοστασία της γλυκόζης είναι περιορισμένα. Μια ενδιαφέρουσα μελέτη από τους Baass et al. έδειξε ότι η PCSK9 φαίνεται να έχει αρνητικές επιπτώσεις στο μεταβολισμό της γλυκόζης ακόμη και σε νεαρά άτομα [53]. Στα παιδιά υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ αυξημένων επιπέδων PCSK9 και γλυκόζης νηστείας, ινσουλίνης, και το ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης της αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-IR). Από την άλλη πλευρά, η σωματική άσκηση [54] καθώς και η νηστεία [55] μείωσαν σημαντικά τις συγκεντρώσεις PCSK9 στο πλάσμα. Άλλα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η PCSK9 μπορεί να εκκρίνεται με τρόπο εξαρτώμενο από την ινσουλίνη [56]. Οι Costet et al. πρότειναν ότι η ηπατική έκφραση της PCSK9 θα μπορούσε να ρυθμίζεται από την ινσουλίνη μέσω της δέσμευσης του ρυθμιστικού στοιχείου στερόλης πρωτεΐνη 1c (sterol regulatory element binding protein 1c) [57].

Στεφανιαία νόσος και PCSK9:

Στους υγιείς ενήλικες δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της PCSK9 και του πάχους του ενδοθηλίου των καρωτίδων και των καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Αυτές οι συσχετίσεις όμως αλλάζουν με την εγκατάσταση στεφανιαίας νόσου. Αρκετές μελέτες με προχωρημένη στεφανιαία νόσο έδειξαν υψηλότερες συγκεντρώσεις της PCSK9 σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου [58]. Οι υψηλές συγκεντρώσεις της PCSK9 σε στεφανιαίους ασθενείς σχετίζεται όταν συνυπάρχει υπέρταση, δυσλιπιδαιμία και λήψη στατίνης, αυξημένες τιμές της C αντιδρώσας πρωτεΐνης hsCRP, γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης A1c και ινσουλίνης [59]. Επίσης με αγγειογραφία (αγγειογραφικό score Gensini) φάνηκε ότι οι ασθενείς με τη σοβαρότερη μορφή στεφανιαίας νόσου είχαν αυξημένες συγκεντρώσεις PCSK9 [60].

Ειδικό Μέρος

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως προκύπτει από την ανάλυση που έχει γίνει μέχρι τώρα, το TIA θα πρέπει να αντιμετωπίζεται άμεσα. Όσο γρηγορότερη είναι η παρέμβαση για την τροποποίηση των παραγόντων κινδύνου τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα υποτροπής. Είναι όμως αρκετοί οι στόχοι που έχουμε βάλει ως ιατρική κοινότητα για τη μείωση των υποτροπών των TIA; Μήπως η PCSK9 θα μπορούσε να αποτελέσει υπό προϋποθέσεις ένα καινοτόμο στόχο για τη μείωση των υποτροπών των ΑΕΕ μετά από TIA; Με αυτή την υπόθεση προχωρήσαμε στην καταγραφή των κλινικοεργαστηριακών χαρακτηριστικών και των πρώιμων εκβάσεων των ασθενών με TIA με σκοπό τη συσχέτισή τους με τις συγκεντρώσεις της PCSK9 και η διερεύνηση της πιθανής συμβολής της αναστολής της PCSK9 στη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και της μείωσης του καρδιαγγειακού κινδύνου και του κινδύνου υποτροπής ΑΕΕ.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ο πληθυσμός της μελέτης

Ο σχεδιασμός της μελέτης ήταν να είναι μια μικρή πιλοτική μελέτη που θα μπορούσε να ολοκληρωθεί σε ένα έτος και αφορούσε περιπτώσεις ασθενών με πρώτη εμφάνιση TIA αθηροσκληρωτικής, μη καρδιοεμβολικής αιτιολογίας. Οι ασθενείς (n = 20) εντάχθηκαν στη μελέτη διαδοχικά, από το Μάιο του 2017 έως το Δεκέμβριο του 2017 στις παθολογικές κλινικές του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και στο Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων «Γεωργίου Χατζηκώστα». Η ομάδα ελέγχου περιλάμβανε 20 διαδοχικά άτομα χωρίς καρδιαγγειακά νοσήματα ίδιου φύλου και ηλικίας με τους ασθενείς, που παρακολουθούνταν

στα εξωτερικά ιατρεία των δύο νοσοκομείων και είχαν προσέλθει για συνήθεις κλινικές και εργαστηριακές εξετάσεις κατά την ίδια περίοδο. Η διάγνωση των ΤΙΑ έγινε με βάση την εγκατάσταση οξέος εστιακού νευρολογικού ελλείμματος (κινητικού ή αισθητικού ή ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς, ή δυσαρθρία) με πλήρη υποχώρησή της σημειολογίας μέσα σε 24 ώρες και απουσία πρόσφατης ισχαιμικής βλάβης στις απεικονιστικές μεθόδους του εγκεφάλου που να δικαιολογούσε το οξύ εστιακό νευρολογικό έλλειμμα. Στους ασθενείς της μελέτης έγινε διαγνωστική απεικόνιση του εγκεφάλου με επείγουσα αξονική τομογραφία (CT) εγκεφάλου χωρίς τη χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας (NCCT) αμέσως ή μέσα σε μία ώρα από την άφιξή του στο νοσοκομείο, για να αποκλειστούν η αιμορραγία και τα μιμητικά νοσήματα των ΑΕΕ. Στους ασθενείς επαναλήφθηκε CT εγκεφάλου ή μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (DW-MRI) μετά από 24-48 ώρες. Στους ασθενείς διενεργήθηκε πλήρης καρδιολογικός έλεγχος για να αποκλειστούν οι καρδιακές παθήσεις που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πηγή εμβολής (συμπεριλαμβανομένης της κολπικής μαρμαρυγής, σοβαρής καρδιακής ανεπάρκειας, λοιμώδους ή μη ενδοκαρδίτιδας, μυξώματος αριστερού κόλπου). Επίσης έγινε νευρολογική και αιματολογική αξιολόγηση για να αποκλειστούν ασθενείς με μιμητικά νοσήματα των εγκεφαλικών επεισοδίων και / ή αιματολογικές καταστάσεις, όπως πολυκυτταραιμία, δρεπανοκυτταρική αναιμία, διαταραχές πήξης, αντιφωσφολιπιδαιμικό σύνδρομο και σοβαρή αναιμία. Ασθενείς με κλινική υποψία ή εργαστηριακές ενδείξεις οξείας ή χρόνιας λοίμωξης ή φλεγμονώδους κατάστασης εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Σε όλους τους ασθενείς και στους μάρτυρες καταγράφηκαν τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά τους: ηλικία, φύλο, δείκτης σωματικής μάζας (ΔΜΣ, kg/m²), συνήθειες καπνίσματος (π.χ. κάπνισμα τους τελευταίους 3 μήνες), υπέρταση (ιστορικό υπέρτασης ή αντιυπερτασική θεραπεία) δυσλιπιδαιμία (ιστορικό ή υπολιπιδαιμική θεραπεία),

σακχαρώδης διαβήτης (ιστορικό ή αντιδιαβητική αγωγή), ιστορικό στεφανιαίας νόσου (CAD) ή ιστορικό περιφερικής αρτηριοπάθειας (PAD).

Επίσης κατά την εισαγωγή καταγράφηκαν η βαθμολογία του score ABCD² (υπολογισμένου με βάση την ηλικία, πίεση αίματος, κλινικά ευρήματα, διάρκεια των συμπτωμάτων και παρουσία ή απουσία σακχαρώδη διαβήτη), η βαθμολογία της τροποποιημένης κλίμακας Rankin (mRS) και της κλίμακας αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων (NIHSS) του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ. Οι ασθενείς επανεξετάστηκαν μία εβδομάδα, ένα μήνα και έξι μήνες μετά την εισαγωγή. Όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν συναίνεση κατόπιν ενημέρωσης και το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής δεοντολογίας.

Μέθοδοι

Οι συνθήκες συλλογής και αποθήκευσης των δειγμάτων ορού ήταν η ακόλουθη: Οι μετρήσεις έγιναν στον ορό των ασθενών μετά από νηστεία τουλάχιστον 12 ωρών έως 24 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Το αίμα συλλέχθηκε χρησιμοποιώντας σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό, και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 3100 στροφές ανά λεπτό (rpm) εντός 30 λεπτών από τη συλλογή. Ο ορός ελήφθη με σιφώνιο και τοποθετήθηκαν σε δύο σωληνάρια Eppendorf 0.5ml ορού στο καθένα. Στη συνέχεια τα δύο δείγματα για κάθε ασθενή αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία $\leq -80^{\circ}\text{C}$ χωρίς να γίνουν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης. Στους ασθενείς μετρήθηκαν τα επίπεδα PCSK9 με τη δοκιμασία Quantikine ELISA Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 Immunoassay. Η κάθαρση της κρεατινίνης (eGFR) υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση: chronic kidney disease epidemiology collaboration equation (CKD-EPI) [17].

Υλικά και όργανα της πειραματικής διαδικασίας

Το Kit της Quantikine ELISA περιείχε μία πλάκα με φρεάτια επιστρωμένα με h-PCSK9, ένα φιαλίδιο με Standard διάλυμα ανθρώπινης PCSK9, ένα φιαλίδιο με πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για h- PCSK9 (Human PCSK9 Conjugate), ένα φιαλίδιο με ρυθμιστικό διάλυμα RD1-9, ένα συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης RD5P, ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, ένα αντιδραστήριο χρώσης A και ένα αντιδραστήριο χρώσης B. Η περιγραφή των ανωτέρω, ο χειρισμός των διαλυμάτων και η διαδικασία συντήρησής τους περιγράφονται παρακάτω:

Διαλύματα/Πλακίδια	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ- ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ
Πλάκα αντίδρασης με h-PCSK9	Πλακίδιο πολυστερένιου με υποδοχές (12 λωρίδες των μονοκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για την PCSK9	96 Οι μη χρησιμοποιούμενες υποδοχές επιστρέφονται στη συσκευασία που περιέχει το αφυγραντικό και ο συσκευασία σφραγίζεται. Η σφραγισμένη συσκευασία μπορεί να διατηρηθεί για ένα μήνα στο ψυγείο (2-8°C) και σε συμφωνία με την ημερομηνία λήξης του Kit.
Πρότυπο ανθρώπινης PCSK9	Ανασυνδυασμένη λυοφιλοποιημένο πρωτεϊνικό ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικό. Οδηγίες για τον όγκο ανασύστασης και σε συμφωνία με την ημερομηνία του διαλύματος παρέχονται στην ετικέτα του φιαλιδίου .	96 Μετά την ανασύσταση το διάλυμα διατηρείται για ένα μήνα στους -20 °C και σε συμφωνία με την ημερομηνία λήξης του kit.
Πολυκλωνικό ειδικό για h- (Human Conjugate)	21 mL/φιαλίδιο πολυκλωνικού αντισώματος, ειδικό για h- PCSK9 συζευγμένο με περοξειδάση αγριοραπανιού, με συντηρητικό.	96 Συντηρείται για ένα μήνα στο ψυγείο σε συμφωνία με την ημερομηνία λήξης του kit.
Ρυθμιστικό RD1-9	Διάλυμα 11 mL/φιαλίδιο που περιέχει πρωτεϊνικό ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικό. Μπορεί να περιέχει ίζημα. Το διάλυμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται καλά για να διαλυθεί το ίζημα.	
Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό αραιώσης RD5P	21 mL/φιαλίδιο με συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:5	
Ρυθμιστικό έκπλυσης	21 mL/φιαλίδιο με 25 φορές συμπυκνωμένο επιφανειοδραστικό ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικό. Το διάλυμα μπορεί να γίνει κιτρινωπό με το πέρασμα της ώρας.	
Αντιδραστήριο A	12 mL/φιαλίδιο με σταθεροποιημένο υπεροξειδίο του υδρογόνου.	
Αντιδραστήριο B	12 mL/φιαλίδιο με σταθεροποιημένο χρωμογόνο (τετραμεθυλοβενζιδίνη).	
Διάλυμα αντίδρασης	6 mL/φιαλίδιο 2 N Θεικού οξέος.	

Αρχή της μεθόδου Quantikine ELISA Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 Immunoassay.

Αυτή η δοκιμασία χρησιμοποιεί την τεχνική ποσοτικής ανοσοδοκιμασίας ενζύμου τύπου σάντουιτς. Σε μία μικροπλάκα προ-επιστρώθηκε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την ανθρώπινη PCSK9. Τα δείγματα λήφθηκαν με πιπέτες και τοποθετήθηκαν εντός των φρεατίων της μικροπλάκας και έτσι ώστε κάθε PCSK9 που υπάρχει στον ορό του ασθενή να δεσμευτεί από το ακινητοποιημένο αντίσωμα που βρίσκεται στο φρεάτιο της μικροπλάκας. Μετά την έκπλυση των μη συνδεδεμένων ουσιών, προστέθηκε στα φρεάτια ειδικό για την ανθρώπινη PCSK9 πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο. Μετά από πλύση για την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένου αντιδραστηρίου αντισώματος-ενζύμου, προστέθηκε στα φρεάτια διάλυμα υποστρώματος και ώστε να αναπτυχθεί χρώμα ανάλογα με την ποσότητα της PCSK9 που δεσμεύτηκε στο αρχικό στάδιο. Στη συνέχεια διακόπηκε η ανάπτυξη χρώματος και μετρήθηκε η ένταση του χρώματος που παράχθηκε και στη συνέχεια υπολογίσθηκαν οι τιμές PCSK9 στο αίμα των ασθενών και των μαρτύρων καθώς και των πρότυπων διαλυμάτων.

Πειραματική πορεία

Τόσο τα αντιδραστήρια και όσο και τα διαλύματα του πειράματος και τα δείγματα των ασθενών και μαρτύρων κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Το φιαλίδιο με το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης RD1-9 αναδεύθηκε ελαφρά σε θερμοκρασία δωματίου για να διαλυθεί τυχόν ίζημα. Στη συνέχεια τέθηκαν 100 μL από το RD1-9, σε κάθε βοθρίο της πλάκας αντίδρασης.

Έπειτα τοποθετήθηκαν 50 μL από το Standard διάλυμα και από τα δείγματα σε κάθε βοθρίο της πλάκας (αφού προηγήθηκε αραιώση) . Η πλάκα αντίδρασης καλύφθηκε με την αυτοκόλλητη ταινία και αφέθηκε για επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συσκευασία του kit υπήρχε ένα έτοιμο διάγραμμα της πλάκας, στο οποίο καταγράφηκε ο μοναδικός αριθμός των δειγμάτων μας, έτσι ώστε να γνωρίζουμε τί αντιστοιχεί σε κάθε θέση (εικόνα 1).

Εικόνα 1. Διάγραμμα της πλάκας κατά την πειραματική διαδικασία

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	AS85	AS61	AS123	AS25	AS14	Χρ161 27/12	Μολ1 16	AS10	AS80	40	120
B	Std1	AS32	AS79	AS128	AS26	AS13	Του1 14/11	Του1 12/11	AS9	AS31	50	130
C	Std2	AS51	AS90	AS36	AS28	AS	Μολ60 24/14	Κι114 21/12	AS24	AS16	60	140
D	Std3	AS18	AS14	AS41	DS5	AS9	Του1 22/13	Του1 23/12	AS88	AS20	70	150
E	Std4	AS47	AS100	AS43	AS1	AS4	Μολ1 11/14	Μολ1 23/12	AS70	AS51	80	160
F	Std5	AS48	AS103	AS69	AS3	AS12	Του1 23/13	Μολ1 12	AS88	LD	90	170
G	Std6	AS57	DS82	AS71	AS2	Του1 17/13	Μολ1 22/13	Μολ1 9/12	AS83	20	100	180
H	Std7	AS58	AS129	AS75	AS4	Μολ1 19/14	Μολ1 23/13	Μολ1 22/12	AS8	30	110	190

Μετά το πέρας των 2 ωρών απομακρύνουμε το περιεχόμενο των βοθρίων της πλάκας αντίδρασης. Σε κάθε βοθρίο τοποθετήθηκαν 400 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης με τη βοήθεια ειδικού σιφωνίου (πολλαπλός διανομέας ELISA). Για βέλτιστο αποτέλεσμα ήταν απαραίτητο να απομακρυνθεί πλήρως το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλήφθηκε άλλες τρεις φορές (σύνολο 4 φορές). Μετά την τελευταία έκπλυση

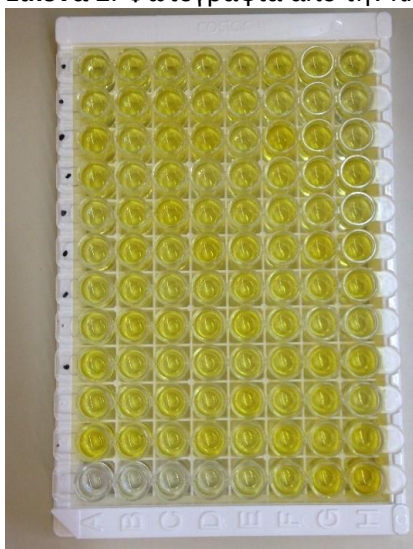
με απόχυση απομακρύνθηκε πλήρως όλη η εναπομείνασα ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Στη συνέχεια η πλάκα αντίδρασης αναποδογυρίστηκε και αφέθηκε πάνω σε διηθητικό χαρτί για να απομακρυνθεί η περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης.

Μετά σε κάθε βοθρίο τοποθετήθηκαν 200 μL του h-PCSK9, η πλάκα αντίδρασης καλύφθηκε με νέα αυτοκόλλητη ταινία και αφέθηκε να επωαστεί για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Με το πέρας της επώασης η διαδικασία αναρρόφησης/έκπλυσης επαναλήφθηκε όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μL από το διάλυμα υποστρώματος σε κάθε βοθρίο και η πλάκα επώασθηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της επώασης δεν έγινε έκθεση της πλάκας στο φως (εικόνα 2).

Μετά το πέρας των 30 λεπτών τοποθετήθηκαν σε κάθε βοθρίο 50 μL του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης χρώσης που είχε ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του χρώματος στα βοθρία από μπλε σε κίτρινο. (Αν το χρώμα σε κάποιο βοθρίο ήταν πράσινο ή μπλε, έπρεπε να ανακινούμε την πλάκα αντίδρασης ελαφρώς για να αναμιχθεί καλά το αντιδραστήριο του τερματισμού της χρώσης, γεγονός που δε συνέβη).

Εικόνα 2. Φωτογραφία από την πλάκα μετά το πέρας της διαδικασίας.



Ακολούθως προσδιορίζουμε την οπτική απορρόφηση για κάθε βοθρίο της πλάκας στα 450 nm, χρησιμοποιώντας μια ειδική συσκευή ανάγνωσης της απορρόφησης και κάθε βοθρίο (Device infinite 200Pro, application: Tecan i-control 1.10.4.0) (εικόνα 3).

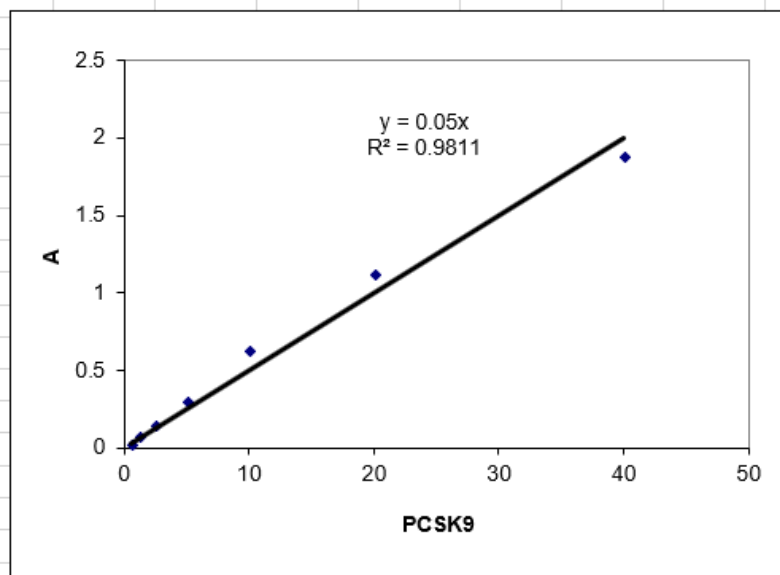
Εικόνα 3. Φωτογραφία από την οθόνη της συσκευής ανάγνωσης της απορρόφησης όπου φαίνονται οι παράμετροι.

Application: Tecan i-control	Tecan i-control , 1.10.4.0
Device: infinite 200Pro	Serial number: 1302003029
Firmware: V_3.37_07/12_Infinite (Jul 20 2012/13.56.47)	Serial number of connected stacker:
Date: 28/2/2018	
Time: 4:59:37 μμ	
System	CHEMLAB-PC
User	CHEMLAB-PC\chem
Plate	Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol Catalog No.: 3361/3590/9018/3591/901
Plate-ID (Stacker)	
Shaking (Linear) Duration:	4 s
Shaking (Linear) Amplitude:	1 mm
Label: Label1	
Mode	Absorbance
Wavelength	450 nm
Bandwidth	9 nm
Number of Flashes	25
Settle Time	0 ms
Start Time	28/2/2018 4:59:41 μμ

Στη συνέχεια σχεδιάσαμε μία καμπύλη απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων (εικόνα 4). Το διάγραμμα δημιουργείται ενώνοντας τα σημεία που προκύπτουν από τη μέση τιμή απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων στον άξονα Y, με τις συγκεντρώσεις τους στον άξονα X. Χρησιμοποιώντας τους λογάριθμους των συγκεντρώσεων της h-PCSK9 με τους λογαρίθμους των απορροφήσεών τους, η καμπύλη είναι ευθεία γραμμή και η καλύτερη δυνατή ευθεία γραμμή σχηματίζεται με στατιστική ανάλυση παλινδρόμησης. Επειδή τα δείγματα είχαν αραιωθεί πριν την πειραματική διαδικασία, η καμπύλη συγκέντρωσης των

προτύπων πολλαπλασιάστηκε με το συντελεστή αραίωσης και έτσι προέκυψαν οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης PCSK9 στα δείγματα των ασθενών και των μαρτύρων.

Εικόνα 4. Η λογαριθμική καμπύλη απορρόφησης-συγκέντρωσης PCSK9 που προέκυψε από τα πρότυπα διαλύματα.



Με τη βοήθεια της καμπύλης που σχηματίστηκε από τα γνωστά διαλύματα και τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων προσδιορίστηκαν οι τιμές της συγκέντρωσης της PCSK9 σε ng/ml.

	PCSK9 ασθενών με TIA	PCSK9 μαρτύρων
1	571.2	213.0
2	331.0	198.2
3	144.4	203.9
4	212.0	225.4
5	279.4	154.7
6	331.5	197.6
7	257.2	154.9
8	230.6	270.8
9	180.6	146.8
10	169.8	106.2
11	122.0	309.8
12	192.7	184.8
13	246.2	184.3
14	234.2	118.1
15	210.2	201.6
16	207.7	164
17	310.4	167.3
18	231.2	290.9
19	224.8	224.1
20	290.2	207.6

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι κατηγορικές μεταβλητές εμφανίζονται ως συχνότητες και ποσοστά. Οι συνεχείς μεταβλητές εμφανίζονται ως μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση (εάν κατανέμεται κανονικά) ή μέση τιμή (εύρος τιμών) σε περίπτωση μη κανονικά κατανεμημένων μεταβλητών. Οι συγκρίσεις των κλινικών χαρακτηριστικών και των βιοχημικών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων αξιολογήθηκαν με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 - (chi-squared) για τις κατηγορικές μεταβλητές και με τη χρήση του t- student test (παραμετρικές μεταβλητές) και τη δοκιμασία Mann-Whitney U (μη παραμετρικές μεταβλητές). Η διαμεταβλητή συσχέτιση Pearson (bivariate) χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της ισχύος και της κατεύθυνσης των γραμμικών σχέσεων μεταξύ των συγκεντρώσεων της PCSK9 και των κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων σε ασθενείς και μάρτυρες. Οι συσχετίσεις των TIA με τις κλινικές και βιοχημικές παραμέτρους αξιολογήθηκαν με ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (regression analysis): για τη μονομεταβλητή ανάλυση, το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε στο 10% για να μειωθεί ο κίνδυνος σφάλματος τύπου II, ενώ στην τελική ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών το επίπεδο σημαντικότητας ήταν 5% ($p=0.05$). Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε ως μια τιμή $p < 0,05$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS σε περιβάλλον Microsoft Windows (SPSS Inc, έκδοση 25.0 για Windows, Chicago, IL).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανθρωπομετρικές παράμετροι

Δημογραφικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

Τα δημογραφικά στοιχεία και τα κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων όσον αφορά την ηλικία, το φύλο, το BMI, τις συνήθειες καπνίσματος, το ιστορικό υπέρτασης, τη δυσλιπιδαιμία, τον σακχαρώδη διαβήτη ή τη λαμβανομένη φαρμακευτική αγωγή.

Επίσης δεν υπήρχαν διαφορές στις μεταβολικές παραμέτρους στους ασθενείς με ΤΙΑ έναντι των μαρτύρων. Σημειωτέων ότι η συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με ΤΙΑ (μέσες τιμές, 248 ng / mL έναντι 196 ng / mL, $p = 0,02$) (Πίνακας 2).

Σε ασθενείς με ΤΙΑ, η PCSK9 στον ορό συσχετίστηκε με την ηλικία ($r = 0,603$, $p = 0,03$), το ιστορικό στεφανιαίας νόσου (CAD) ($r = 0,515$, $p = 0,020$) και τη ABCD² βαθμολογία ($r = 0,512$, $p = 0,021$) (Πίνακας 3).

Στην ομάδα ελέγχου, οι συγκεντρώσεις PCSK9 στον ορό συσχετίστηκαν με το ιστορικό δυσλιπιδαιμίας ($r = 0,027$, $p = 0,027$) και τα επίπεδα HDL χοληστερόλης ($r = 0,474$, $p = 0,035$).

Στη μονομεταβλητή δυαδική στατιστική ανάλυση (univariate binary logistic analysis) φάνηκε ότι η συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό (Odds ratio, OR, ανά 10 ng / mL αύξηση, 1,17, με 95% διάστημα εμπιστοσύνης, CI 1,02-1,34, $p = 0,028$) και η συγκέντρωση της HDL-χοληστερόλης (OR 1.06, 95% CI 0.99-1.12, $p = 0,089$) συσχετίστηκαν με υψηλότερες πιθανότητες ΤΙΑ (Πίνακας 4). Στην πολυμεταβλητή ανάλυση, μόνο η συγκέντρωση της PCSK9

στον ορό σχετίζονταν ανεξάρτητα με τα TIA (OR ανά 10 ng / mL αύξηση, 1,16, 95% CI 1,01-1,34, $p = 0,035$) (Πίνακας 4).

Πολύπαραγοντική ανάλυση και μονοπαραγοντική ανάλυση

Στην πολύπαραγοντική ανάλυση μελετήθηκε μόνο η HDL σε σχέση με την PCSK9 και δε βρέθηκε να αλλάξει η συσχέτιση. Η HDL παρέμεινε ανεξάρτητη μεταβλητή, $p\text{-value} = 0,975$ 95% C.I. (0,975-1,127). Στην μονοπαραγοντική ανάλυση για τη μεταβολή των συγκεντρώσεων της PCSK9 στον ορό των ασθενών με TIA κατά 10 μονάδες η πιθανότητα Odds Ratio ήταν 1.17 με 95% CI: 1.02-1.34; $p=0.028$. Η πολύπαραγοντική ανάλυση συμπεριέλαβε της δύο παραμέτρους για τις οποίες η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε $p < 0.1$. Έτσι για μεταβολή των συγκεντρώσεων της PCSK9 στον ορό κατά 10 μονάδες ο λόγος των πιθανοτήτων Odds Ratio ήταν 1.16, με 95% CI: 1.01-1.34 ($p=0.035$).

Πίνακας 1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Μεταβλητή	Ασθενείς με TIA (N=20)	Ομάδα ελέγχου (N=20)	p-value
Ηλικία, έτη	68 ± 13	68 ± 9	0.946
άνδρες, n (%)	14 (70)	16 (80)	0.782
BMI, kg/m ²	27.8 ± 2.6	29.2 ± 4.7	0.394
κάπνισμα, n (%)	6 (30)	5 (25)	0.789
Ιστορικό υπέρτασης, n (%)	10(50)	10 (50)	N/A
Ιστορικό δυσλιπιδαιμίας, n (%)	11 (55)	11 (55)	N/A
Ιστορικό διαβήτη, n (%)	6 (30)	6 (30)	N/A
Ιστορικό CAD, n (%)	2 (10)	0 (0)	N/A
Ιστορικό PAD, n (%)	0 (0)	0 (0)	N/A

Φαρμακευτική αγωγή που ελάμβανε			
Αντιυπερτασική, n (%)	10(50)	10 (50)	N/A
Θειαζιδικά, n	5	6	
Ανταγωνιστές ασβεστίου, n	5	4	
Αναστολής ρενίνης αγγειοτενσίνης, n	8	7	
Βήτα αποκλειστές, n	2	2	
Από του στόματος αντιδιαβητικά, n (%)	6 (30)	6 (30)	N/A
Ινσουλίνη, n (%)	0	0	N/A
Στατίνη, n (%)	10 (50)	11(55)	N/A
Άλλα υπολιπιδαιμικά, n (%)	0	0	N/A
Ασπιρίνη, n (%)	3 (15)	2 (10)	0.673
Κλινικά χαρακτηριστικά			
Συστολική Πίεση, mmHg	147 ± 22	142 ± 18	0.516
Διαστολική Πίεση, mmHg	80 ± 10	80 ± 12	0.859
ABCD2 score	3.85 ± 1.46	N/A	N/A
mRS στην εισαγωγή	2.85 ± 1.18	N/A	N/A
NIHSS στην εισαγωγή	5.05 ± 2.46	N/A	N/A
Υποτροπή:			
1η εβδομάδα, n (%)	0	N/A	N/A
1ο μήνα, n (%)	1	N/A	N/A
1ο εξάμηνο, n (%)	0	N/A	N/A

Συνοτμοεύσεις: BMI for Body Mass Index (Δείκτης Μάζας Σώματος), CAD for Coronary Artery Disease (Στεφανιαία Νόσος), PAD for Peripheral Artery Disease (Περιφερική αρτηριοπάθεια) . SD, Standard Deviation (Σταθερή Απόκλιση), Το ABCD² score υπολογίζεται από 5 παραμέτρους (ηλικία, αρτηριακή πίεση, κλινική εικόνα, διάρκεια του TIA, και παρουσία διαβήτη); mRS, τροποποιημένη κλίμακα Rankin; NIHSS, κλίμακα National Institutes of Health Stroke.

Πίνακας 2. Βιοχημικά Δεδομένα του πληθυσμού της μελέτης

Μεταβλητή	Ασθενείς με TIA (N=20)	Ομάδα ελέγχου (N=20)	p-value
TC, mg/dL	191 ± 42	177 ± 38	0.267
LDL-C, mg/dL	110 ± 35	103 ± 29	0.626
TG, mg/dL	135 ± 64	134 ± 58	0.914
HDL-C, mg/dL	53 ± 15	46 ± 7	0.126
ApoB, mg/dL	87 ± 26	82 ± 23	0.665
ApoA1, mg/dL	139 ± 22	152 ± 21	0.088
Lp(a), mg/dL	12 (2-66)	8 (2-132)	0.343
PCSK9, ng/mL	248 ± 94	196 ± 29	0.020
Serum creatinine, mg/dL	1.00 ± 0.22	0.99 ± 0.10	0.933
Serum fasting glucose, mg/dL	123 ± 65	130 ± 60	0.703
eGFR, mL/min/1.73m ²	77 ± 22	77 ± 16	0.844

Συντμήσεις: TC, ολική χοληστερόλη; LDL-C, χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών; TG, τριγλυκερίδια; HDL-C, χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών; Apo, απολιποπρωτεΐνη; Lp, λιποπρωτεΐνη; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; eGFR, υπολογισμένη με την εξίσωση CKD-EPI σπειραματική διήθηση.

Μετατροπές: για τη μετατροπή της χοληστερόλης, LDL-C ή HDL-C από [mg/dl] σε [mmol/L] πολλαπλασιάστε με το 0.02586; για τη μετατροπή των TG από [mg/dL] σε [mmol/L] πολλαπλασιάστε με 0.0113; για τη μετατροπή της γλυκόζης αίματος από [mg/dL] σε [mmol/L] πολλαπλασιάστε με 0.0555; για τη μετατροπή της κρεατινίνης ορού από [mg/dL] σε [mmol/L] πολλαπλασιάστε με 0.0884.

Πίνακας 3. Binary logistic regression ανάλυση για τη συσχέτιση των βιοχημικών παραμέτρων με τα ΤΙΑ

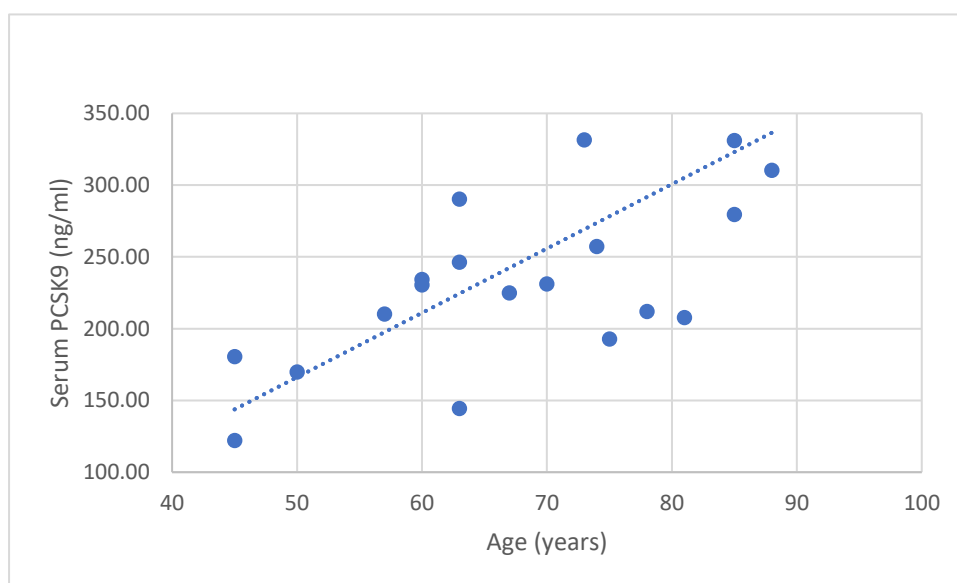
Μεταβλητή	ΤΙΑ ασθενείς		ομάδα ελέγχου	
	r	P-value	r	P-value
Ηλικία, έτη	0.634	0.003	-0.380	0.099
Άνδρες	-0.057	0.810	-0.075	0.752
BMI, kg/m ²	0.562	0.438	-0.259	0.271
Κάπνισμα	-0.216	0.360	0.060	0.800
Ηx υπέρτασης	0.033	0.890	-0.036	0.881
Ηx δυσλιπιδαιμίας	0.393	0.086	0.493	0.027
Ηx CAD	0.515	0.020	N/A	N/A
Ηx PAD	N/A	N/A	N/A	N/A
Συστολική πίεση	-0.196	0.408	0.191	0.419
Διαστολική πίεση	-0.416	0.068	0.158	0.505
TC, mg/dL	0.066	0.781	0.188	0.427
TG, mg/dL	0.061	0.797	0.003	0.991
HDL-C, mg/dL	0.387	0.092	0.474	0.035
LDL-C, mg/dL	-0.107	0.653	0.142	0.550
ApoA1, mg/dL	0.299	0.200	0.322	0.166
ApoB, mg/dL	-0.291	0.213	0.184	0.437
Lp (a), mg/dL	-0.325	0.162	0.091	0.703
ABCD ²	0.512	0.021	N/A	N/A
mRS	-0.116	0.625	N/A	N/A
NIHSS	-0.016	0.947	N/A	N/A

Συντημήσεις: Ηx, ιστορικό; N/A, δεν εφαρμόζεται; BMI, δείκτης μάζας σώματος; CAD, στεφανιαία νόσος; PAD, περιφερική αρτηριοπάθεια; BP, αρτηριακή πίεση; Το ABCD² score υπολογίζεται από 5 παραμέτρους (ηλικία, αρτηριακή πίεση [HYPERLINK "https://en.wikipedia.org/wiki/Blood_pressure"](https://en.wikipedia.org/wiki/Blood_pressure), κλινική εικόνα, διάρκεια του ΤΙΑ, και παρουσία διαβήτη); mRS, τροποποιημένη κλίμακα Rankin; NIHSS, κλίμακα National Institutes of Health Stroke.

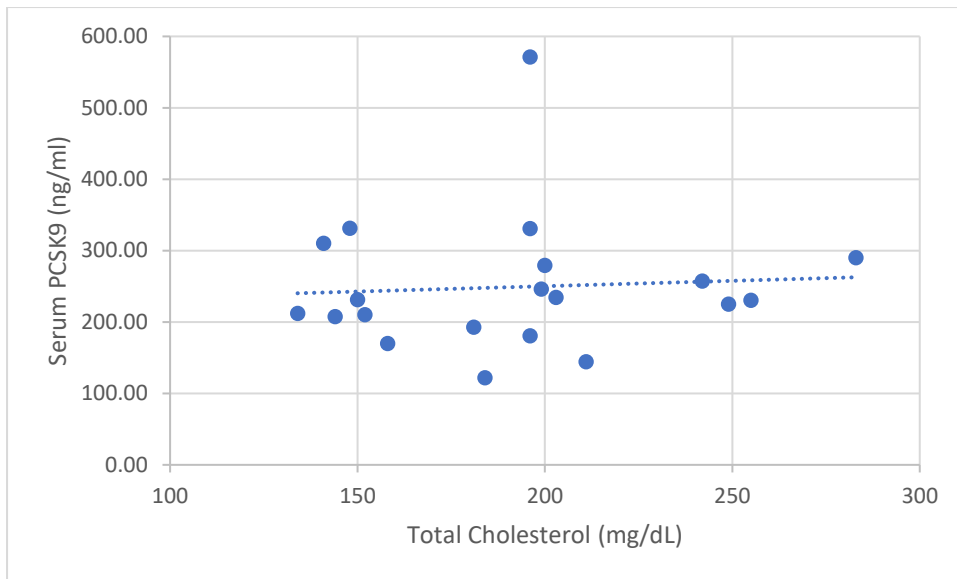
Πίνακας 4. Πολύπαραγοντική ανάλυση (Binary logistic regression analysis) για τη συσχέτιση των βιοχημικών παραμέτρων των ασθενών με ΤΙΑ (επιλεγμένα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά),

Variable	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Odds ratio	95% CI	P-value	Odds ratio	95% CI	P-value
Ηλικία, έτη	0.99	0.94-1.06	0.879			
Άνδρες	1.71	0.40-7.34	0.468			
BMI, kg/m ²	0.93	0.72-1.19	0.557			
Ηx υπέρτασης	1.00	0.29-3.45	1.000			
TC	1.01	0.99-1.03	0.283			
TG	1.00	0.99-1.01	0.967			
HDL-C, mg/dL	1.06	0.99-1.12	0.089	1.05	0.97-1.13	0.20
LDL-C, mg/dL	1.01	0.99-1.03	0.512			
ApoA1, mg/dL	0.97	0.94-1.00	0.088			
ApoB, mg/dL	1.01	0.98-1.03	0.535			
Lp (a), mg/dL	0.99	0.97-1.01	0.618			
PCSK9 (per 10 ng/mL increase)	1.17	1.02-1.34	0.028	1.16	1.01-1.34	0.035

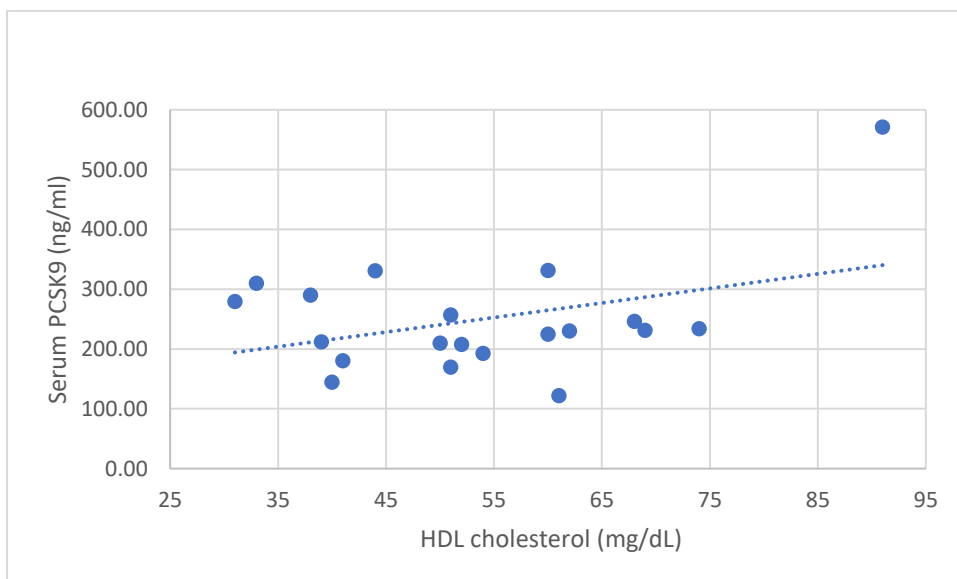
Scatter διαγράμματα διαμεταβλητών συσχετίσεων (Bivariate Correlations) στον πληθυσμό των ασθενών με ΤΙΑ των συγκεντρώσεων της PCSK9 με άλλες κλινικοεργαστηριακές μεταβλητές.



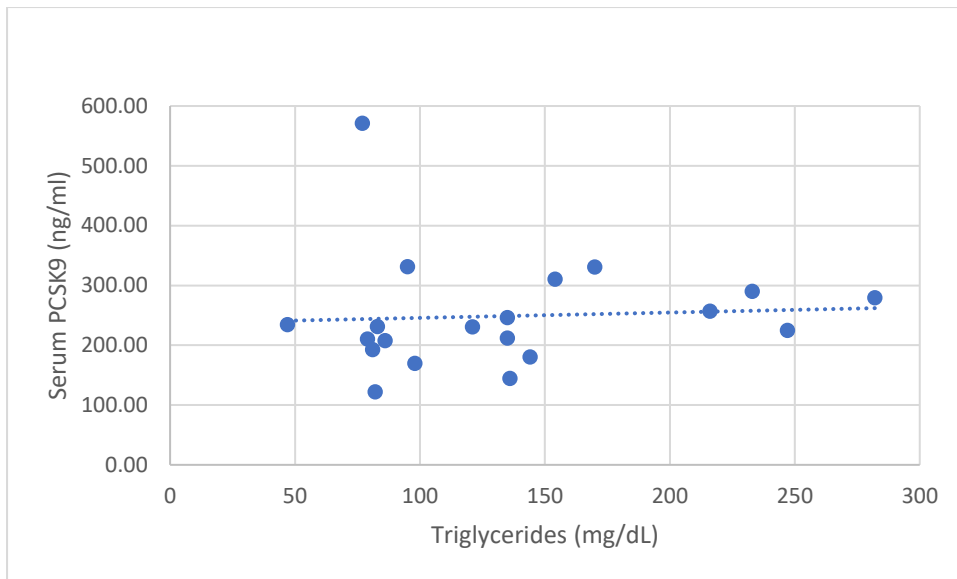
Διάγραμμα 1: διαμεταβλητή συσχέτιση των συγκεντρώσεων της PCSK9 του ορού με την ηλικία στην ομάδα των ΤΙΑ; $r=0.634$; $p=0.01$



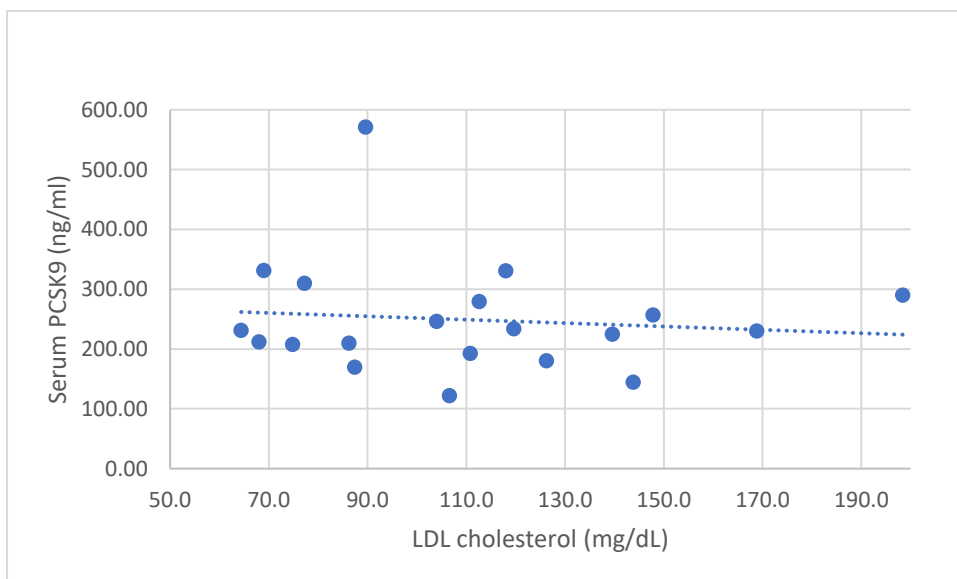
Διάγραμμα 2: διαμεταβλητή συσχέτιση των συγκεντρώσεων της PCSK9 του ορού με την ολική χοληστερόλη στην ομάδα των TIA $r=0.066$; $p=0.390$



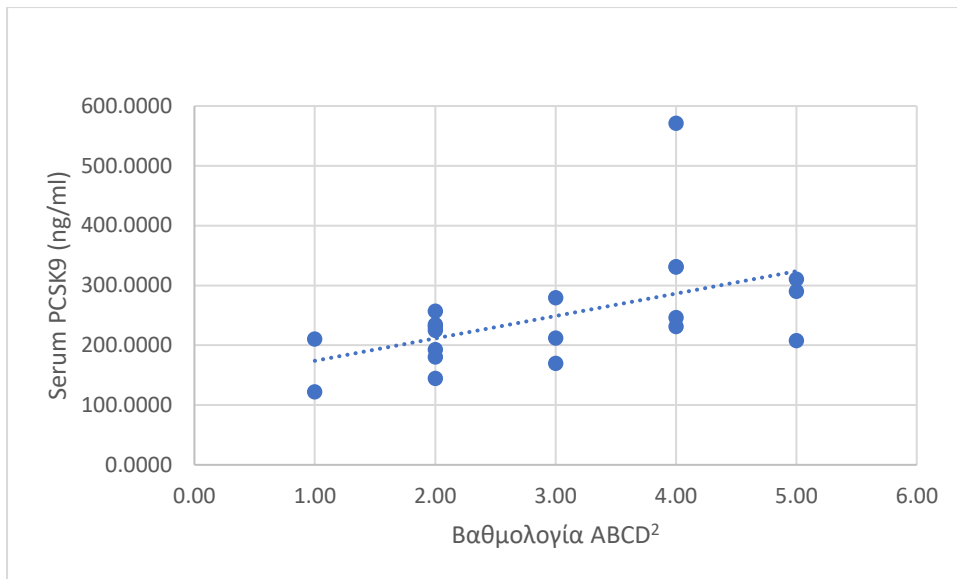
Διάγραμμα 3: διαμεταβλητή συσχέτιση των συγκεντρώσεων της PCSK9 του ορού με την HDL χοληστερόλη στην ομάδα των TIA; $r=0.387$; $p=0.092$



Διάγραμμα 4: διαμεταβλητή συσχέτιση των συγκεντρώσεων της PCSK9 του ορού με τα τριγλυκερίδια του ορού; $r=0.61$, $p=0.797$

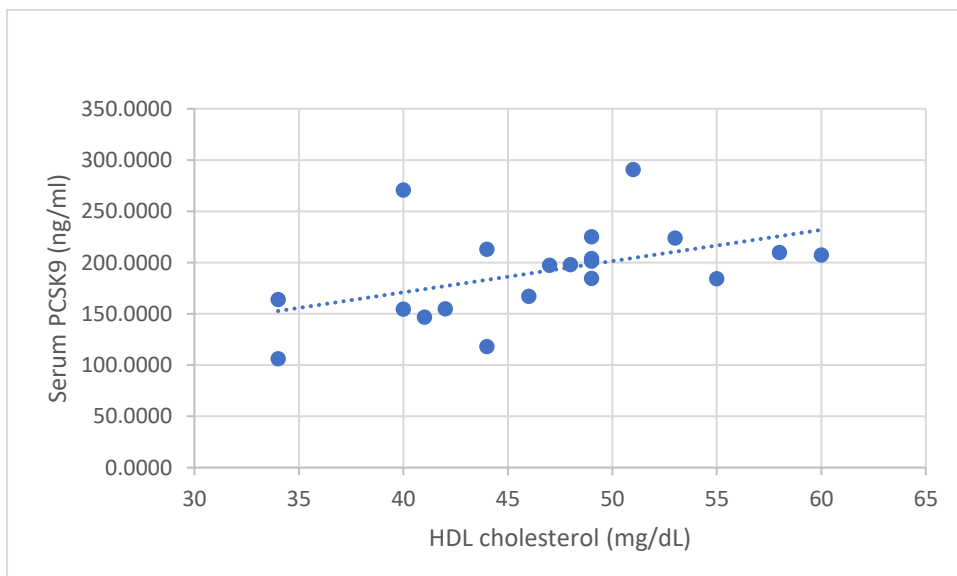


Διάγραμμα 5: διαμεταβλητή συσχέτιση των συγκεντρώσεων της PCSK9 του ορού με την LDL χοληστερόλη του ορού; $r=-0.107$, $p=0,653$



Διάγραμμα 6: διαμεταβλητή συσχέτιση των συγκεντρώσεων της PCSK9 του ορού με τη βαθμολογία $abcd^2$; $r=0.512$, $p=0.021$

Scatter διάγραμμα της διαμεταβλητής συσχέτισης (Bivariate Correlation) στην ομάδα ελέγχου των συγκεντρώσεων της PCSK9 με την HDL.



Διάγραμμα 6: διαμεταβλητή συσχέτιση των συγκεντρώσεων της PCSK9 του ορού στον πληθυσμό της ομάδας ελέγχου με τη συγκέντρωση στον ορό της HDL χοληστερόλης; $r=0.474$, $p=0.035$

Τελικές εκβάσεις στους 6 μήνες μετά το συμβάν

Οι τελικές εκβάσεις καταγράφηκαν μία εβδομάδα, έναν μήνα και ένα εξάμηνο μετά το συμβάν: οι ασθενείς επανεξετάζονταν στο τακτικό ιατρείο στην εβδομάδα, το μήνα και το εξάμηνο για τυχόν επανάληψη του παροδικού ισχαιμικού επεισοδίου, ή εγκατάσταση μόνιμης εστιακής νευρολογικής συνδρομής, ή ασταθούς στηθάγχης ή εμφράγματος του μυοκαρδίου. Από όλους τους ασθενείς με ΤΙΑ της μελέτης μία μόνο ασθενής επανεμφάνισε αιμωδία στο αριστερό άνω άκρο ένα μήνα μετά το παροδικό επεισόδιο και η βλάβη αυτή τη φορά ήταν μόνιμη. Τα συμπτώματα του ΤΙΑ αφορούσαν δυσαρθρία και διαταραχές της αισθητικότητας του αριστερού άνω άκρου, γεγονός που παραπέμπει στο ίδιο αγγείο του εγκεφάλου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη μας υποδηλώνει ότι οι συγκεντρώσεις PCSK9 στον ορό σχετίζονται ανεξάρτητα με υψηλότερη πιθανότητα TIA και συσχετίζονται με τον κίνδυνο μελλοντικού εγκεφαλικού επεισοδίου σε ασθενείς με TIA, όπως εκτιμάται από το ABCD². Παρόλο που ήταν μια μικρή πιλοτική μελέτη, βρέθηκαν ενδιαφέροντα ευρήματα. Η μελέτη μας επιβεβαίωσε ότι οι συγκεντρώσεις της PCSK9 στον ορό αυξήθηκαν με την αύξηση της ηλικίας [53], αλλά απέτυχε να παρουσιάσουν οποιεσδήποτε συσχετίσεις με άλλα κλινικά χαρακτηριστικά (π.χ. φύλο, παχυσαρκία), μεταβολικές παραμέτρους ή λιπιδαιμικό προφίλ.

Ο ρόλος της PCSK9 σε σχέση με την υπερχοληστερολαιμία και την αθηροσκλήρωση έχει μελετηθεί καλά. Η αύξηση των μεταλλάξεων gain of function στο γονίδιο της PCSK9 προκαλεί υπερχοληστερολαιμία [61], ενώ οι ετερόζυγοι με nonsense μεταλλάξεις της PCSK9 οδηγούν σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα LDL χοληστερόλης στο πλάσμα [62]. Ο μηχανισμός που εξηγεί αυτά τα ευρήματα είναι η αποδόμηση των LDL υποδοχέων με τη βοήθεια της PCSK9. Το εξω-μεμβρανικό τμήμα των LDL υποδοχέων έχει μια θέση πρόσδεσης (EGF-A, περιοχή ομοιάζουσα με τον επιδερμικό αυξητικού παράγοντα A) για το PCSK9 και όταν η PCSK9 και το LDL σωματίδιο δεσμεύονται στον LDL υποδοχέα, ενδοκυττάρωνονται σε ένα ενδοσώμα [63] σε μια διαδικασία φαγοκυττάρωσης διαμεσολαβούμενη από clathrin που καταλήγει μέχρι την αποδόμηση του υποδοχέα LDL [44]. Κλασικά, η συσχέτιση του PCSK9 με την αθηροσκλήρωση έχει συνδεθεί με λιγότερους υποδοχείς LDL στην επιφάνεια της μεμβράνης του ηπατοκυττάρου που οδηγεί σε αύξηση των προαθηρογόνων σωματιδίων LDL που κυκλοφορούν.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα αυξημένα επίπεδα PCSK9 στον ορό σχετίζονται με σοβαρή αθηροσκλήρωση και υψηλότερα ποσοστά οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, που προκαλούνται από ασταθείς στεφανιαίες πλάκες [11]. Δύο αναδρομικές, αγγειογραφικές μελέτες αναφέρουν αύξηση των επιπέδων της PCSK9 σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου έναντι σταθερής CAD [64]. Η PCSK9 συνδέεται με ευπάθεια των αθηρωματικών πλακών μέσω πολλών βιοχημικών οδών, συμπεριλαμβανομένης της προφλεγμονώδους οξείδωσης των σωματιδίων LDL και της άμεσης τροποποίησης της σύνθεσης αθηρωματικής πλάκας [49]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης ότι η PCSK9 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε μια πλάκα που έχει υποστεί ρήξη. Πράγματι, τα επίπεδα PCSK9 συσχετίζονται με τη συγκέντρωση θρομβοξάνης 11-dh-TXB2 στα ούρα ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, υποδηλώνοντας έτσι ότι η PCSK9 μπορεί να εμπλέκεται στην ευόδωση της διαδικασίας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων [65]. Εκτός από τον LDL υποδοχέα, η PCSK9 μπορεί επίσης να συνδέεται στον υποδοχέα απολιποπρωτεΐνης E (ApoER2) ο οποίος παρουσιάζει 46% ομολογία στην αλληλουχία του με τον LDL υποδοχέα. Αυτή η σύνδεση ενεργοποιεί την κυτοσολική φωσφολιπάση A₂ (cPLA₂) μέσω της οδού p38MAPK. Ο καταρράκτης της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στη συνέχεια ενεργοποιείται με την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος [66].

Γενικά, η συμβολή της PCSK9 στην αστάθεια των αθηρωματικών πλακών και στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αντιπροσωπεύει αρκετά "ελκυστικούς" υποκείμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που εξηγούν τον αυξημένο κίνδυνο για αθηροσκληρωτικής αιτιολογίας TIA σε άτομα με αυξημένη PCSK9.

Τα συμπεράσματά μας πρέπει να ερμηνευθούν υπό το πρίσμα ορισμένων περιορισμών. Πρόκειται για μια μικρή πιλοτική διατμηματική μελέτη. Η μεροληψία του σφάλματος επιλογής

δεν θα μπορούσε να αποφευχθεί πλήρως, παρά τη δυνατότητα εφαρμογής αυστηρών κριτηρίων και μεθοδολογίας ένταξης στη μελέτη. Από την άλλη πλευρά, στις μελέτες σε ζώα η ίδια η ισχαιμία επάγει την αυξημένη σύνθεση PCSK9, η οποία οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης PCSK9 στον ορό 12 έως 96 ώρες (μέγιστη τιμή 48 ώρες) μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Από την άποψη αυτή, ενδιαφέρει πολύ η μελέτη της κινητικής της PCSK9 τόσο στην οξεία [67]όσο και στην μετά την οξεία (σταθερή) κατάσταση των ασθενών με TIA.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, αυτή η πιλοτική μελέτη παρέχει ενδιαφέροντα στοιχεία που συνδέουν τη συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό με τα TIA και τον κίνδυνο μελλοντικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Κατ' αναλογία με τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, η θεραπεία με αναστολείς PCSK9 θα μπορούσε να ωφελήσει ασθενείς με TIA μέσω της μείωσης των επιπέδων της LDL χοληστερόλης και μέσω της πρώιμης σταθεροποίησης της πλάκας μέσω αντιφλεγμονωδών και αντιθρομβωτικών μηχανισμών. Επομένως, για την επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων ή την αξιολόγηση της PCSK9 ως στόχου θεραπείας μετά από TIA απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι συγκεντρώσεις στον ορό της πρωτεϊνικής κονβερτάσης σουμπτιλισίνη /κεξίνη τύπου 9 (PCSK9) σχετίζονται με υπερχοληστερολαιμία και νοσήματα που οφείλονται σε αθηροσκλήρωση, ενώ είναι γνωστό ότι η αναστολή της μειώνει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό είναι αυξημένη σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο λόγω της προαθηρογόνου και προθρομβωτικής κατάστασης.

Σκοπός: Αυτή η πιλοτική μελέτη ελέγχου ασθενών μαρτύρων διερεύνησε τις συσχετίσεις των συγκεντρώσεων της PCSK9 στον ορό ασθενών με παροδικό ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (TIA) με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.

Μέθοδοι: Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 20 ασθενείς με πρώτο επεισόδιο αθηροσκληρωτικής, μη καρδιοεμβολικής, αιτιολογίας TIA , και 20 μάρτυρες παρόμοιας ηλικίας και φύλου. Κατεγράφησαν τα κλινικά χαρακτηριστικά, οι μεταβολικές παράμετροι, συμπεριλαμβανομένων των τιμών της συγκέντρωσης της PCSK9 στον ορό εντός 24 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων του TIA.

Αποτελέσματα: Η συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με TIA έναντι των μαρτύρων (μέσες τιμές, 248 ng/mL έναντι 196 ng/mL, $p=0,02$). Σε ασθενείς με TIA, η συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό συσχετίστηκε με την ηλικία ($r=0,603$, $p=0,03$), το ιστορικό στεφανιαίας νόσου (CAD) ($r = 0,515$, $p = 0,020$) και τη βαθμολογία ABCD² ($r=0,512$, $p=0,021$). Με πολυπαραγοντική ανάλυση, η συγκέντρωση της PCSK9 στον ορό συσχετίστηκε ανεξάρτητα με υψηλότερη πιθανότητα για TIA (Odds 1,16 ανά αύξηση 10 ng/mL, 95% CI 1,01-1,34, $p=0,035$).

Συμπεράσματα: Τα ευρήματά μας δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις της PCSK9 στον ορό σχετίζονται ανεξάρτητα με τα αθηροσκληρωτικής αιτιολογίας TIA και τον κίνδυνο μελλοντικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Για να επιβεβαιωθούν αυτά τα ευρήματα ή για να αποτελέσει η PCSK9 στόχο στη θεραπεία για την πρόληψη του εγκεφαλικού επεισοδίου ή την έγκαιρη θεραπεία του απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

ABSTRACT

Background: Proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 (PCSK9) is associated with hypercholesterolemia and atherosclerotic disease while its inhibition reduces cardiovascular risk. Serum PCSK9 is elevated in patients with acute coronary syndromes owing to a proatherogenic and prothrombotic state.

Objective: This case-control pilot study investigated the associations of PCSK9 with transient ischemic attack (TIA).

Methods: A total of 20 patients with a first-ever atherosclerotic non-cardioembolic TIA and 20 controls of similar age and sex were enrolled. Clinical characteristics, metabolic parameters, including serum PCSK9 within 24 hours from the onset of TIA symptoms were recorded.

Results: Serum PCSK9 concentration was higher in TIA patients vs. controls (mean values, 248 ng/mL vs. 196 ng/mL, $p = 0.02$). In patients with TIA, serum PCSK9 correlated with age ($r=0.603$, $p=0.03$), history of coronary artery disease (CAD) ($r=0.515$, $p=0.020$) and ABCD² score ($r=0.512$, $p=0.021$). In multivariate analysis, serum PCSK9 was independently associated with a higher odd of TIA (1.16 per 10 ng/mL increase, 95% CI 1.01-1.34, $p = 0.035$).

Conclusions: Our findings indicate that serum PCSK9 levels are independently associated with atherosclerotic TIA and risk of future stroke. To confirm these findings or use PCSK9 as a treatment target for stroke prevention or early treatment further investigation is needed.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Albers, G.W., et al., *Transient ischemic attack--proposal for a new definition*. N Engl J Med, 2002. **347**(21): p. 1713-6.
2. Kernan, W.N., et al., *Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association*. Stroke, 2014. **45**(7): p. 2160-236.
3. Amarenco, P., et al., *One-Year Risk of Stroke after Transient Ischemic Attack or Minor Stroke*. N Engl J Med, 2016. **374**(16): p. 1533-42.
4. Wardlaw, J.M., et al., *ABCD2 score and secondary stroke prevention: meta-analysis and effect per 1,000 patients triaged*. Neurology, 2015. **85**(4): p. 373-80.
5. Yakhkind, A., et al., *Minor Stroke and Transient Ischemic Attack: Research and Practice*. Front Neurol, 2016. **7**: p. 86.
6. Brainin, M., et al., *Acute neurological stroke care in Europe: results of the European Stroke Care Inventory*. Eur J Neurol, 2000. **7**(1): p. 5-10.
7. Lavalley, P.C., et al., *A transient ischaemic attack clinic with round-the-clock access (SOS-TIA): feasibility and effects*. Lancet Neurol, 2007. **6**(11): p. 953-60.
8. Amarenco, P., et al., *Five-Year Risk of Stroke after TIA or Minor Ischemic Stroke*. N Engl J Med, 2018.
9. Ruscica, M., et al., *Circulating Levels of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 and Arterial Stiffness in a Large Population Sample: Data From the Brisighella Heart Study*. J Am Heart Assoc, 2017. **6**(5).
10. Horton, J.D., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(2): p. 71-7.

11. Almontashiri, N.A., et al., *Plasma PCSK9 levels are elevated with acute myocardial infarction in two independent retrospective angiographic studies*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106294.
12. Sabatine, M.S., et al., *Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease*. N Engl J Med, 2017. **376**(18): p. 1713-1722.
13. Powers, W.J., et al., *2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association*. Stroke, 2018. **49**(3): p. e46-e110.
14. Lovett, J.K., et al., *Very early risk of stroke after a first transient ischemic attack*. Stroke, 2003. **34**(8): p. e138-40.
15. Johnston, S.C., et al., *Short-term prognosis after emergency department diagnosis of TIA*. Jama, 2000. **284**(22): p. 2901-6.
16. Hyafil, F., et al., *Rupture of nonstenotic carotid plaque as a cause of ischemic stroke evidenced by multimodality imaging*. Circulation, 2014. **129**(1): p. 130-1.
17. Jung, J.M., et al., *Predictors of recurrent stroke in patients with symptomatic intracranial arterial stenosis*. Stroke, 2012. **43**(10): p. 2785-7.
18. Wilson, J.T., et al., *Improving the assessment of outcomes in stroke: use of a structured interview to assign grades on the modified Rankin Scale*. Stroke, 2002. **33**(9): p. 2243-6.
19. Adams, H.P., Jr., et al., *Baseline NIH Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke: A report of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)*. Neurology, 1999. **53**(1): p. 126-31.
20. Amarenco, P., et al., *Does ABCD2 score below 4 allow more time to evaluate patients with a transient ischemic attack?* Stroke, 2009. **40**(9): p. 3091-5.

21. *Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008.* Cerebrovasc Dis, 2008. **25**(5): p. 457-507.
22. Merwick, A., et al., *Addition of brain and carotid imaging to the ABCD(2) score to identify patients at early risk of stroke after transient ischaemic attack: a multicentre observational study.* Lancet Neurol, 2010. **9**(11): p. 1060-9.
23. Favilla, C.G., et al., *Predictors of finding occult atrial fibrillation after cryptogenic stroke.* Stroke, 2015. **46**(5): p. 1210-5.
24. Sudacevschi, V., et al., *Predictors of Occult Atrial Fibrillation in One Hundred Seventy-One Patients with Cryptogenic Transient Ischemic Attack and Minor Stroke.* J Stroke Cerebrovasc Dis, 2016. **25**(11): p. 2673-2677.
25. Sposato, L.A., et al., *Diagnosis of atrial fibrillation after stroke and transient ischaemic attack: a systematic review and meta-analysis.* Lancet Neurol, 2015. **14**(4): p. 377-87.
26. Amarenco, P., J. Labreuche, and P.C. Lavallee, *Patients with transient ischemic attack with ABCD2 <4 can have similar 90-day stroke risk as patients with transient ischemic attack with ABCD2 >/=4.* Stroke, 2012. **43**(3): p. 863-5.
27. Hart, R.G., et al., *Rivaroxaban for Stroke Prevention after Embolic Stroke of Undetermined Source.* N Engl J Med, 2018. **378**(23): p. 2191-2201.
28. Rothwell, P.M., et al., *Effect of urgent treatment of transient ischaemic attack and minor stroke on early recurrent stroke (EXPRESS study): a prospective population-based sequential comparison.* Lancet, 2007. **370**(9596): p. 1432-42.
29. *The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke.* International Stroke Trial Collaborative Group. Lancet, 1997. **349**(9065): p. 1569-81.

30. *CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20,000 patients with acute ischaemic stroke. CAST (Chinese Acute Stroke Trial) Collaborative Group.* Lancet, 1997. **349**(9066): p. 1641-9.
31. Sandercock, P.A., et al., *Oral antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke.* Cochrane Database Syst Rev, 2014(3): p. Cd000029.
32. Wang, Y., et al., *Clopidogrel with aspirin in acute minor stroke or transient ischemic attack.* N Engl J Med, 2013. **369**(1): p. 11-9.
33. Johnston, S.C. and P. Amarenco, *Ticagrelor versus Aspirin in Acute Stroke or Transient Ischemic Attack.* N Engl J Med, 2016. **375**(14): p. 1395.
34. Johnston, S.C., et al., *Clopidogrel and Aspirin in Acute Ischemic Stroke and High-Risk TIA.* N Engl J Med, 2018.
35. *Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack.* Lancet, 2001. **358**(9287): p. 1033-41.
36. Benavente, O.R., et al., *Blood-pressure targets in patients with recent lacunar stroke: the SPS3 randomised trial.* Lancet, 2013. **382**(9891): p. 507-15.
37. Visvanathan, A., M. Dennis, and W. Whiteley, *Parenteral fluid regimens for improving functional outcome in people with acute stroke.* Cochrane Database Syst Rev, 2015(9): p. Cd011138.
38. Catapano, A.L., et al., *2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias.* Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2017. **70**(2): p. 115.
39. Amarenco, P., et al., *High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack.* N Engl J Med, 2006. **355**(6): p. 549-59.

40. Kennedy, J., et al., *Fast assessment of stroke and transient ischaemic attack to prevent early recurrence (FASTER): a randomised controlled pilot trial*. *Lancet Neurol*, 2007. **6**(11): p. 961-9.
41. Robinson, J.G., et al., *Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(16): p. 1489-99.
42. Huffman, K.M., et al., *Exercise effects on lipids in persons with varying dietary patterns- does diet matter if they exercise? Responses in Studies of a Targeted Risk Reduction Intervention through Defined Exercise I*. *Am Heart J*, 2012. **164**(1): p. 117-24.
43. McEvoy, R.D., et al., *CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(10): p. 919-31.
44. Urban, D., et al., *Targeting the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(16): p. 1401-8.
45. Norata, G.D., G. Tibolla, and A.L. Catapano, *Targeting PCSK9 for hypercholesterolemia*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2014. **54**: p. 273-93.
46. Seidah, N.G., et al., *PCSK9: a key modulator of cardiovascular health*. *Circ Res*, 2014. **114**(6): p. 1022-36.
47. Hori, M., et al., *Removal of plasma mature and furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin 9 by low-density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: development and application of a new assay for PCSK9*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(1): p. E41-9.
48. Feingold, K.R., et al., *Inflammation stimulates the expression of PCSK9*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **374**(2): p. 341-4.

49. Navarese, E.P., et al., *From proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to its inhibition: state-of-the-art and clinical implications*. Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother, 2016. **2**(1): p. 44-53.
50. Pirillo, A. and A.L. Catapano, *PCSK9 inhibition and Lp(a) reduction: another piece of the puzzle?* Eur Heart J, 2018.
51. Sharotri, V., et al., *Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)*. J Biol Chem, 2012. **287**(23): p. 19266-74.
52. Abujrad, H., et al., *Chronic kidney disease on hemodialysis is associated with decreased serum PCSK9 levels*. Atherosclerosis, 2014. **233**(1): p. 123-9.
53. Baass, A., et al., *Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents*. Clin Chem, 2009. **55**(9): p. 1637-45.
54. Kamani, C.H., et al., *Stairs instead of elevators at the workplace decreases PCSK9 levels in a healthy population*. Eur J Clin Invest, 2015. **45**(10): p. 1017-24.
55. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans*. J Lipid Res, 2010. **51**(11): p. 3359-63.
56. Cariou, B., et al., *Association between plasma PCSK9 and gamma-glutamyl transferase levels in diabetic patients*. Atherosclerosis, 2010. **211**(2): p. 700-2.
57. Costet, P., et al., *Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6211-8.
58. Li, S., et al., *Proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 as a biomarker for the severity of coronary artery disease*. Ann Med, 2015. **47**(5): p. 386-93.

59. Werner, C., et al., *Risk prediction with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in patients with stable coronary disease on statin treatment*. *Vascul Pharmacol*, 2014. **62**(2): p. 94-102.
60. Li, S., et al., *Plasma PCSK9 levels are associated with the severity of coronary stenosis in patients with atherosclerosis*. *Int J Cardiol*, 2014. **174**(3): p. 863-4.
61. Abifadel, M., et al., *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia*. *Nat Genet*, 2003. **34**(2): p. 154-6.
62. Cohen, J., et al., *Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9*. *Nat Genet*, 2005. **37**(2): p. 161-5.
63. Nassoury, N., et al., *The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR*. *Traffic*, 2007. **8**(6): p. 718-32.
64. Navarese, E.P., et al., *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Monoclonal Antibodies for Acute Coronary Syndrome: A Narrative Review*. *Ann Intern Med*, 2016. **164**(9): p. 600-7.
65. Pastori, D., et al., *Relationship of PCSK9 and Urinary Thromboxane Excretion to Cardiovascular Events in Patients With Atrial Fibrillation*. *J Am Coll Cardiol*, 2017. **70**(12): p. 1455-1462.
66. Korporaal, S.J., et al., *Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(11): p. 2476-83.
67. Zhang, Y., et al., *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression is transiently up-regulated in the acute period of myocardial infarction in rat*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014. **14**: p. 192.