



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ**  
**ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Ι/Δ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ**  
**ΤΟΥ ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ**  
**ΚΑΙ ΑΓΓΕΛΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ**

**ΜΑΡΚΟΥΛΑ ΣΟΦΙΑ**  
**ΙΑΤΡΟΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008**



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).



**Ημερομηνία αίτησης της κ. Μαρούλα Σοφίας: 15-1-2002**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 467<sup>α</sup>/2-4-2002**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Κυρίτσης Αθανάσιος Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Λαγός\* Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πολυζωΐδης Κωνσταντίνος Αναπληρωτή Καθηγητή Νευροχειρουργικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 4-11-2002**

*«I/D πολυμορφισμοί του Γονιδίου του Μετατρεπτικού Ενζύμου και Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια»*

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής 524<sup>α</sup>/27-1-2004**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Κυρίτσης Αθανάσιος Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής – Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Λαγός Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 646<sup>α</sup>/22-10-2008**

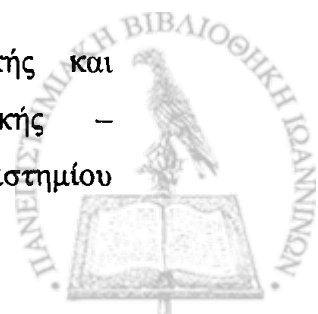
**Κυρίτσης Αθανάσιος** Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Γουδέβενος Ιωάννης** Καθηγητής Παθολογίας – Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Μπουραντάς Κωνσταντίνος** Καθηγητής Παθολογίας – Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Τσατσούλης Αγαθοκλής** Καθηγητής Παθολογίας – Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Γεωργίου Ιωάννης** Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής Μαιευτικής – Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Λαγός Γεώργιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κονιτσιώτης Σπυρίδων

Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-11-2008

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής



ΘΕΛΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Ευχαριστώ τον Καθηγητή μου, κύριο Αθανάσιο Κυρίτση, που με δίδαξε όσα γνωρίζω, μου έμαθε να ασκώ τη Νευρολογία με ήθος και υπομονή, μου έδωσε την ευκαιρία να αναλάβω πρωτοβουλίες, με εμπιστεύτηκε, με υποστήριξε στις επιλογές μου και με βοήθησε να αναπτύξω πιθανές ικανότητές μου.*

*Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας, κύριο Λαγό Γεώργιο, που από φοιτήτρια ακόμη, ήταν πάντα στο πλευρό μου να με εμπνέει με την απaráμιλλη πνευματικότητα και την καλοσύνη του και να με καθοδηγεί στο δρόμο της γνώσης και της υπέρβασης.*

*Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής, κύριο Ιωάννη Γεωργίου, που με μύησε στο χώρο της Γενετικής και των ερευνητικών προγραμμάτων, μου άνοιξε νέους ορίζοντες στη γνώση και με βοήθησε στο δύσκολο δρόμο της αέναης προσπάθειας για επιστημονική ολοκλήρωση.*

*Ευχαριστώ την Ιατρική Σχολή Ιωαννίων, που στους κόλπους της μαθαίνω, μεγαλώνω, εξελίσσομαι και δημιουργώ από τα 18 μου χρόνια, ήδη τη μισή μου ζωή...*



## ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ...

*Σε όλους αυτούς, που μαζί κοπιάσαμε, καταθέσαμε ψυχή και πνεύμα, ξενυχτήσαμε πάνω από τον άρρωστο για να μάθουμε Νευρολογία!*

*Σε όλους όσους μας δίδαξαν Νευρολογία και μας έκαναν να την αγαπήσουμε!*

*Στον Καθηγητή μας!*

*Στα παιδιά μου Ιάσονα και Ύνώ, που τα στερήθηκα και τους στέρησα χρόνο, για να μπορέσω να ανταποκριθώ στις δύσκολες συνθήκες της δουλειάς μου!*

*Στους γονείς μου και την αδερφή μου, που με στήριξαν και συνεχίζουν να με στηρίζουν στις όποιες επιλογές και δυσκολίες!*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια, είναι μια συχνή νόσος, που προσβάλλει άντρες και γυναίκες. Παρουσιάζει μεγάλη θνησιμότητα και εγκατάλειψη σοβαρότατων αναπηριών.

Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη και η έρευνα προσπαθεί να δώσει λύσεις τόσο σε επίπεδο θεραπευτικής προσέγγισης όσο και σε επίπεδο πρωτογενούς και δευτερογενούς πρόληψης.

Η γενετική βάση των Αγγειακών Εγκεφαλικών Επεισοδίων, όπως και άλλων συχνών πολυπαραγοντικών νοσημάτων, απασχολεί πολλές ερευνητικές ομάδες, επιστημονικές εταιρείες καθώς και φαρμακευτικές εταιρείες.

Η βελτίωση των γενετικών μεθόδων και προσεγγίσεων έχει οδηγήσει στην παραγωγή μεγάλου αριθμού δεδομένων, τα οποία είναι δύσκολο, έως σήμερα, να αξιολογηθούν ή να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη με ουσιαστικό τρόπο. Όμως αν και κάθε πολυγονιδιακή προσέγγιση δεν έχει άμεσα κλινικά εφαρμόσιμα αποτελέσματα, δημιουργεί νέα ερωτηματικά για τη γενετική προδιάθεση, που εξαρτάται κυρίως από τον ιδιαίτερο πληθυσμό της κάθε μελέτης και το φύλο των ασθενών.

Αν χρησιμοποιήσουμε τις κλασικές γνώσεις της γενετικής, θα πρέπει να λάβουμε υπόψιν δύο σημαντικούς παράγοντες που αναμένεται να δημιουργούν την ποικιλομορφία στην προδιάθεση. Αφενός η πληθυσμιακή σύσταση σε σχέση με τους περιβαλλοντικούς προδιαθεσικούς παράγοντες της κάθε γεωγραφικής περιοχής παραμορφώνει ή συσκοτίζει την αμιγώς γενετική προδιάθεση. Αφετέρου οι διαφορές των δύο φύλων θα πρέπει να θεωρούνται θεμελιώδεις για την κατανόηση των προδιαθεσικών παραγόντων, αφού είναι γνωστό ότι η γενετική βάση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων είναι περισσότερο έκδηλη στο φύλο που προσβάλεται σε μικρότερη συχνότητα από το νόσημα.

Με τους ανωτέρω προβληματισμούς σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε η παρούσα μελέτη, ως μέρος μιας ευρύτερης μελέτης, που υποβλήθηκε στη ΓΓΕΤ και χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια του ΠΕΝΕΛ 2003. Το φυσικό αντικείμενο του έργου είναι η πολυπαραγοντική ανάλυση μιας σειράς γνωστών από τη βιβλιογραφία προδιαθεσικών γονιδίων στην ανάπτυξη ισχαιμικού τύπου



αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων (ΑΕΕ), τα οποία θα μπορούσαν, ανάλογα με το βαθμό συσχέτισής τους, να αποτελέσουν τις δομικές μονάδες αλγορθμου με σκοπό την πρόληψη, πρωτογενή και δευτερογενή.

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή αφορά στους I/D πολυμορφισμούς του αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου του συστήματος ρενίνης αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης. Εκπονήθηκε στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, υπό την εποπτεία του Καθηγητή Αθανάσιου Κυρίτση και με την υποστήριξη του Επίκουρου Καθηγητή Νευρολογίας, υπεύθυνου στα ΑΕΕ, Σωτήρη Γιαννόπουλου.

Το εργαστηριακό κομμάτι διενεργήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής της Μαιευτικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, υπό την εποπτεία του Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Γεωργίου.





# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>1</b>
1. ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ	3
1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	3
1.2. ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΕΠΕΙΣΟΔΙΩΝ	5
1.3. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΑ	7
1.4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	8
2. ΙΣΧΑΙΜΙΚΑ ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ (ΙΑΕΕ)	13
2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	13
2.1.1. ΘΡΟΜΒΩΤΙΚΑ ΑΕΕ	13
2.1.2. ΕΜΒΟΛΙΚΑ ΑΕΕ	13
2.1.3. ΑΕΕ ΑΠΟ ΧΑΜΗΛΗ ΠΑΡΟΧΗ ΑΙΜΑΤΟΣ	14
2.2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	15
2.3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΙΑΕΕ	17
2.4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ- ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	21
2.5. ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ	31
2.5.1. ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ	31
2.5.2. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ	34
2.5.3. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΗ ΑΓΩΓΗ	39
3. Το ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΕΝΙΝΗΣ-ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ-ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	40
3.1. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	40
3.2. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ	48
4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΠΟΣΕΙΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΙΣΧΑΙΜΙΚΩΝ ΑΕΕ	56
4.1. ΠΕΡΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ	56
4.2. ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΕΕ	59
4.3. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΕΝΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ	62
4.4. I/D ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΕΝΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΕΕ	65



<b><i>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i></b>	<b>67</b>
1. ΣΤΟΧΟΙ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΝΤΑΞΗΣ	69
1.1. ΠΡΩΤΕΥΩΝ ΣΤΟΧΟΣ	69
1.2. ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΕΣ ΣΤΟΧΟΙ	69
2. ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	69
2.1. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΝΤΑΞΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	69
2.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ	70
3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	74
3.1. ΕΞΑΓΩΓΗ DNA	74
3.1.1 ΑΡΧΕΣ ΕΞΑΓΩΓΗΣ DNA	74
3.2. PCR	75
3.2.1 ΑΡΧΕΣ PCR	75
3.2.3. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΣΗΣ	77
3.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%	77
3.3.1. ΑΡΧΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%	77
3.4. ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	79
4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	80
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	92
6.1. ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΑ – ΠΟΛΥΓΟΝΙΔΙΑΚΑ- ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	92
6.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ (GWAS) ΜΕ ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	94
6.3. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ (GWAS) ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ	95
6.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	96
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	102
<b><i>Γ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i></b>	<b>105</b>
<b><i>Δ. SUMMARY</i></b>	<b>107</b>
<b><i>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i></b>	<b>109</b>



# *ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ*



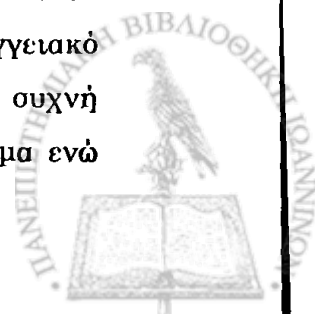
# 1. ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ

## 1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο θεωρείται η κλινική οντότητα, όπου η μειωμένη παροχή αίματος σε κάποιο σημείο ή τμήμα του εγκεφάλου προκαλεί μειωμένη παροχή οξυγόνου και γλυκόζης στον εγκεφαλικό ιστό, με αποτέλεσμα τη μείωση της λειτουργίας των νευρώνων, που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή βλάβη ή και σε θάνατο εγκεφαλικών κυττάρων στο σημείο ή στο τμήμα με τη μειωμένη παροχή αίματος (1).

Το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) είναι μια επείγουσα κατάσταση, που αν δε διαγνωστεί και αντιμετωπιστεί εγκαίρως - συχνά ακόμη και όταν αντιμετωπιστεί - μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές αναπηρίες (Γράφημα 1) ή ακόμη και στο θάνατο. Τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια αποτελούν μεγάλο πρόβλημα των σύγχρονων κοινωνιών, λόγω του μεγάλου ποσοστού αναπηριών, που παραμένουν στα προσβεβλημένα άτομα. Σε ένα ποσοστό 50% των προσβεβλημένων ατόμων εγκαταλείπονται αναπηρίες, που τα καθιστά μόνιμα εξαρτημένα, 25% των ασθενών χρειάζονται εφόρου ζωής φροντίδα από φροντιστή και μόνο 25% επανέρχονται στην κινητική κατάσταση, που βρισκόταν πριν από το επεισόδιο.

Τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, είναι η τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες, ιδιαίτερα σε ηλικίες μεγαλύτερες των 60 ετών (Γράφημα 2). Είναι η σημαντικότερη αιτία πρόκλησης αναπηρίας στην Ευρώπη και στις Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ μέσα στις επόμενες δεκαετίες προβλέπεται να αποτελέσουν την πρωτεύουσα αιτία θανάτου (2,3). Κάθε έτος η συχνότητα των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων υπολογίζεται περί τα 250 επεισόδια ανά 100.000 κατοίκους, με τη μεγαλύτερη συχνότητα στη Σκωτία και τη μικρότερη συχνότητα στις χώρες της Μεσογείου. Στις ΗΠΑ περισσότεροι από 600.000 ασθενείς κάθε χρόνο παρουσιάζουν αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, 25% από αυτούς είναι <65 ετών και περισσότεροι από 160.000 καταλήγουν σε θάνατο από αίτια άμεσα ή έμμεσα σχετιζόμενα με το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Τα ΑΕΕ θεωρούνται επίσης ως η δεύτερη πιο συχνή αιτία άνοιας, η πρώτη κατά σειρά αιτία επιληψίας σε ηλικιωμένα άτομα ενώ



αποτελούν και σύνηθες αίτιο κατάθλιψης. Οι άντρες προσβάλλονται κατά 1.25 φορές πιο συχνά από ΑΕΕ σε σχέση με τις γυναίκες (4,5).

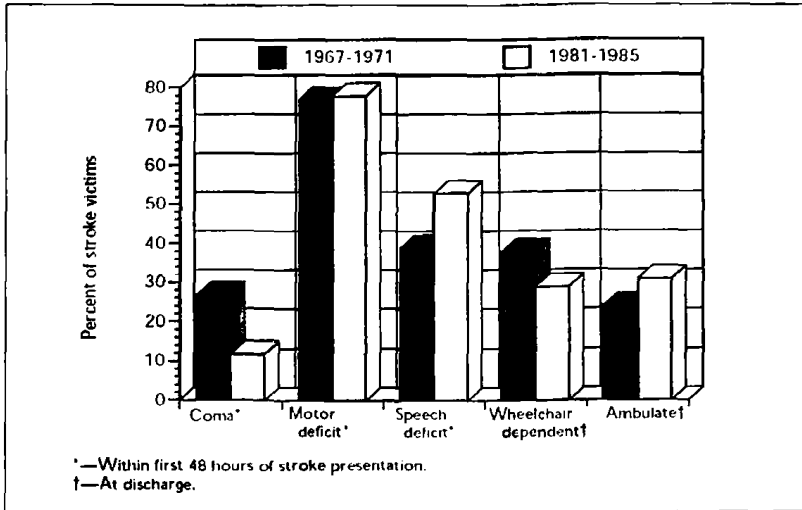


Figure 3. Major complications from stroke. (Data from Barker WH, Mullooly JP. Stroke in a defined elderly population, 1967-1985. A less lethal and disabling but no less common disease. Stroke. 1997;28:284-290.)

### Γράφημα 1: Σοβαρές επιπλοκές των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων

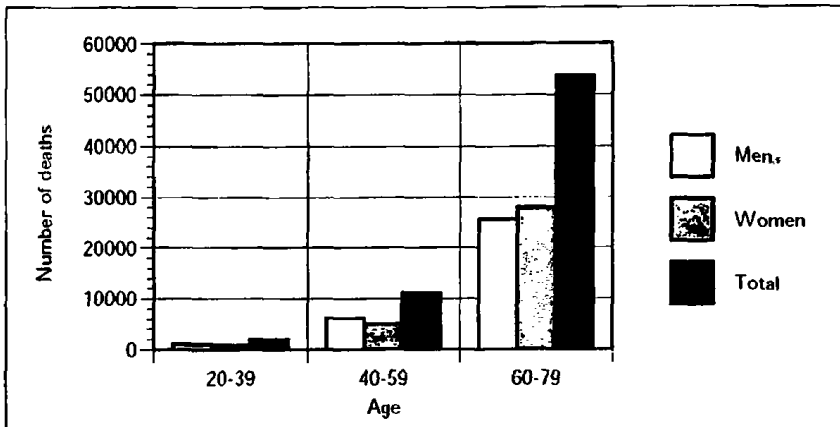
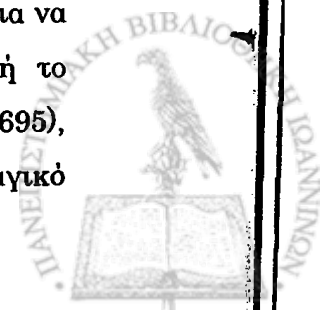


Figure 1. Deaths from stroke by age in 1995. (Data from Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 1999. CA Cancer J Clin. 1999;49:8-31.)

### Γράφημα 2: Η θνητότητα στα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια με την πρόοδο της ηλικίας

Ο Ιπποκράτης (460-370 πΧ) ήταν ο πρώτος που περιέγραψε την οξεία παράλυση, η οποία μπορεί να προκληθεί μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. «Αποπληξία» είναι ο όρος που χρησιμοποίησε στα γραπτά του για να περιγράψει το υπεύθυνο για την οξεία παράλυση φαινόμενο, δηλαδή το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Το 1658 ο Johann Jacob Werfer (1620-1695), στο βιβλίο του αποπληξία, προσδιόρισε ως αιτία της αποπληξίας το αιμορραγικό

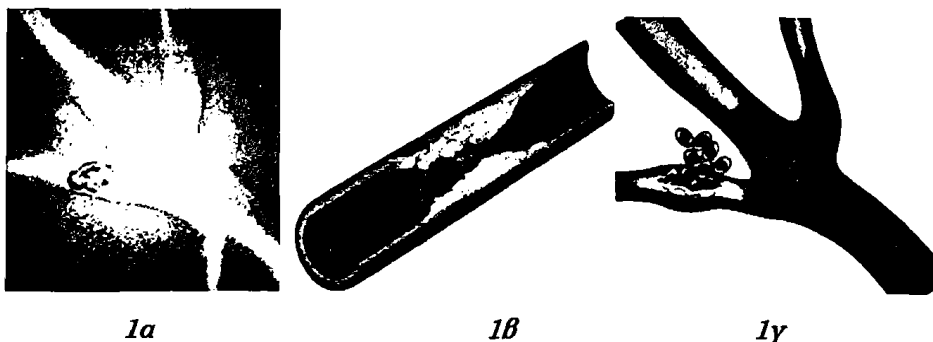


ΑΕΕ, περιγράφοντας την ανεύρεση αίματος στον εγκέφαλο ατόμων, που είχαν καταλήξει μετά από ΑΕΕ. Επίσης στο ίδιο σύγγραμμα ο Werfer προσδιόρισε τις βασικές αρτηρίες που τροφοδοτούν τον εγκέφαλο με αίμα, τις σπονδυλικές και καρωτιδικές αρτηρίες, και ανέπτυξε τη θεωρία της πρόκλησης ισχαιμικού ΑΕΕ επί αποφράξεων των αρτηριών αυτών. Το 1970 από τη Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) δόθηκε ο ορισμός των εγκεφαλικών επεισοδίων ως το νευρολογικό έλλειμμα αγγειακής εγκεφαλικής αιτιολογίας, το οποίο παραμένει περισσότερο από 24 ώρες ή καταλήγει σε θάνατο εντός 24 ωρών. Ο ορισμός αποσκοπούσε στο να αναδείξει την αναστρεψιμότητα της βλάβης του εγκεφαλικού ιστού και το χρονικό περιθώριο των 24 ωρών τέθηκε αυθαίρετα. Το όριο των 24 ωρών χώρισε τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια από τα παροδικά ισχαιμικά επεισόδια στα οποία το νευρολογικό έλλειμμα λύνεται εντός του 24ώρου, σύμφωνα με τον παλαιότερο ορισμό.

## 1.2. ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΕΠΕΙΣΟΔΙΩΝ

Τα ΑΕΕ διαιρούνται στα ισχαιμικά και στα αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια, και προκαλούνται από στένωση ή απόφραξη του αγγείου και από ρήξη του αγγείου και εξαγγείωση αίματος αντίστοιχα (Εικόνα 1, Πίνακας 1). Τα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια αποτελούν το 80% των εγκεφαλικών επεισοδίων και τα αιμορραγικά το 20% του συνόλου αυτών. Τα ισχαιμικά ΑΕΕ, με τη σειρά τους χωρίζονται στα θρομβωτικά, στα καρδιοεμβολικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και στα επεισόδια από χαμηλή παροχή αίματος. Τα αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια διακρίνονται στην ενδοεγκεφαλική αιμορραγία, στην υπαρχνοειδή αιμορραγία και στα αιματώματα, ενώ οι υπαρχνοειδείς αιμορραγίες διακρίνονται στις περιπτώσεις που προκαλούνται από ρήξη ανευρύσματος και σε αυτές χωρίς ρήξη ανευρύσματος. Ως ενδοεγκεφαλική αιμορραγία ορίζεται η εξαγγείωση αίματος μέσα στον εγκέφαλο. Η ενδοπαρεγχυματική και η ενδοκοιλιακή αιμορραγία είναι περιπτώσεις ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας (Εικόνα 2).



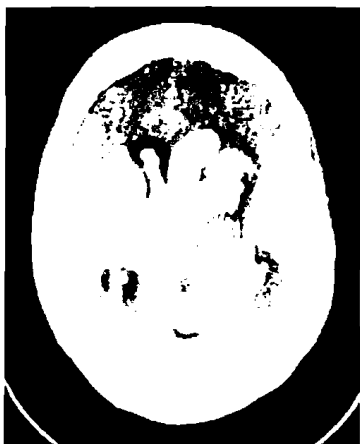


1α

1β

1γ

Εικόνα 1: Τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια προκαλούνται από εμβολή ή θρόμβωση του αγγείου (1α, 1β) ή από ρήξη του αγγείου και εξαγγείωση αίματος (1γ).

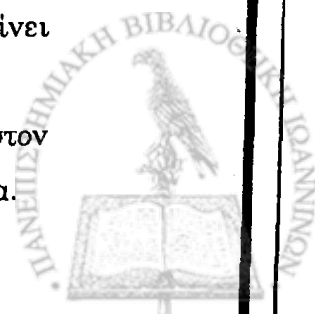


Εικόνα 2: Ενδοπαρεγχυματική και ενδοκοιλιακή αιμορραγία

Στην ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία επισυμβαίνει αιμορραγία μέσα στον εγκεφαλικό ιστό. Προκαλείται γενικότερα από ρήξη μικρών αρτηριών ή αρτηριολίων και οφείλεται σε υπέρταση, τραυματισμό, διαταραχές της αιμόστασης, αμυλοειδική αγγιοπάθεια, χρήση ουσιών, όπως είναι οι αμφεταμίνες και η κοκαΐνη, και αγγειακές δυσπλασίες. Η αιμορραγία μπορεί να συνεχίσει να αυξάνει σε μέγεθος, έως ότου οι γύρω ιστοί περιορίσουν την αύξησή της ή επεκταθεί στις κοιλίες και στο χώρο του ΕΝΥ. Στην ενδοκοιλιακή αιμορραγία η ρήξη του αγγείου προκαλείται μέσα στις κοιλίες και μπορεί στη συνέχεια να επεκταθεί στον υπόλοιπο υπαρχνοειδή χώρο ή προς το εγκεφαλικό παρέγχυμα.

Στο επισκληρίδιο αιμάτωμα η αιμορραγία συμβαίνει ανάμεσα στη σκληρά μήνιγγα και στο κρανίο, ενώ στο υποσκληρίδιο αιμάτωμα επισυμβαίνει στον υποσκληρίδιο χώρο.

Στην υπαρχνοειδή αιμορραγία προκαλείται αιμορραγία στον υπαρχνοειδή χώρο, ανάμεσα στην αρχνοειδή και στη χοριοειδή μήνιγγα.



Αγγειακά Εγκεφαλικά ΕπεισόδιαΙσχαιμικά (80%)

- Θρόμβωση: Διατριαιών κλάδος  
Μεγάλη Αρτηρία
- Εμβολή: Καρδιογενής  
Από την αορτή  
Από αρτηρία σε αρτηρία
- Μείωση συστηματικής άρδευσης

Αιμορραγικά (20%)Πίνακας 1: Διαίρεση των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων1.3. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΑ

Τα συμπτώματα των εγκεφαλικών επεισοδίων αναπτύσσονται ταχέως σε δευτερόλεπτα ή ελάχιστα λεπτά. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από την ανατομική θέση του αγγείου, που ισχαιμεί ή αιμορραγεί, αν και η φύση και η βαρύτητα μπορεί να ποικίλει. Τα συμπτώματα των ΑΕΕ είναι ετερογενή και ασθενείς με παρόμοια βλάβη στον εγκεφαλικό ιστό μπορεί να έχουν διαφορετικά συμπτώματα και ελλείμματα. Κατά τον ίδιο τρόπο ασθενείς με παρόμοια συμπτώματα και σημειολογία μπορεί να έχουν διαφορετικές βλάβες, με διαφορετική έκταση και εντόπιση. Τα συχνότερα συμπτώματα που εμφανίζει ένας ασθενής με ΑΕΕ είναι:

- |   |     |
|---|-----|
| <input type="checkbox"/> Εστιακή κινητική έκπτωση | 82% |
| <input type="checkbox"/> Αισθητική έκπτωση        | 45% |
| <input type="checkbox"/> Κεφαλαλγία               | 27% |
| <input type="checkbox"/> Διαταραχές λόγου·σύγχυση | 24% |





<input type="checkbox"/> Ημιανουσία	14%
<input type="checkbox"/> Διαταραχές ισορροπίας	11%
<input type="checkbox"/> Επιληπτικές κρίσεις	1%
<input type="checkbox"/> Τλιγγος	2%

Κατά τη νευρολογική εξέταση, προκειμένου να μπορέσει να εκτιμήσει τη θέση και την έκταση της βλάβης ο Νευρολόγος εξετάζει:

Το επίπεδο εγρήγορσης του ασθενούς

Το λόγο

Την ύπαρξη αυχενικής δυσκαμψίας

Τις εγκεφαλικές συζυγίες

Την ύπαρξη νυσταγμού

Τη μυική ισχύ των άνω και κάτω άκρων

Την επιπολής αισθητικότητα

Την εν τω βάθει αισθητικότητα

Την ύπαρξη παρεγκεφαλιδικών σημείων

Την ύπαρξη εξωπυραμιδικών σημείων

Τα τενόντια αντανακλαστικά

Τα επιπολής αντανακλαστικά

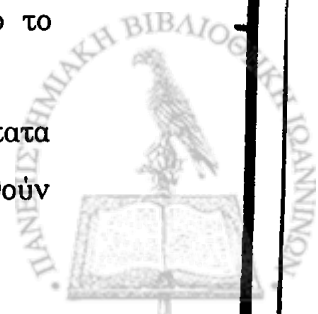
Το μυικό τόνο

Την ορθοστάτηση και τη βάδιση

#### 1.4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση των εγκεφαλικών επεισοδίων προϋποθέτει καταρχάς τη νευρολογική εξέταση, εφόσον η διάγνωση είναι κλινική, που επιβεβαιώνεται ακτινολογικά. Με την αξονική τομογραφία, η οποία διενεργείται πάντα κατά την οξεία φάση, μπορεί να γίνει η διαφορική διάγνωση ανάμεσα στο ισχαιμικό και αιμορραγικό ΑΕΕ, έτσι ώστε να γίνει η σωστή θεραπευτική προσέγγιση. Η αξονική τομογραφία, η εξέταση που πραγματοποιείται κατά την οξεία φάση, έχει μικρή ευαισθησία για την ανάδειξη ισχαιμικής βλάβης κατά τις πρώτες ώρες και η δυνατότητά της απεικόνισης του ισχαιμικού εξαρτάται από το μέγεθος και την εντόπιση αυτού.

Αναλυτικότερα, η συμβατική αξονική τομογραφία είναι ευρύτατα διαδεδομένη, απεικονίζει αξιόπιστα άλλες παθήσεις, που μπορεί να μιμηθούν



κλινικά ένα ΑΕΕ, και επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ οξέος ισχαιμικού και αιμορραγικού ΑΕΕ για διάστημα 5-7 ημερών από την εγκατάστασή του (6,7,8). Η άμεση διενέργεια CT εγκεφάλου σε ασθενείς με οξύ ΑΕΕ αποτελεί την πλέον οικονομική απεικονιστική μέθοδο (9). Η αξονική τομογραφία εγκεφάλου είναι λιγότερο ευαίσθητη, σχεδόν όμως εξίσου ειδική με τη μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου σε ότι αφορά στην πρόωμη ανίχνευση ισχαιμικών βλαβών (10). Δύο στους τρεις ασθενείς με ήπιο ως σοβαρό ΑΕΕ παρουσιάζουν ήδη, εντός των πρώτων ωρών, σαφείς πρόωμες ισχαιμικές αλλοιώσεις στην αξονική τομογραφία (6,10,11). Αντίθετα, υπολογίζεται ότι λιγότεροι από τους μισούς ασθενείς με ήπιο ΑΕΕ παρουσιάζουν εντός των πρώτων ωρών ανάλογες απεικονιστικές αλλοιώσεις (6). Στις πρόωμες ισχαιμικές αλλοιώσεις, που απεικονίζονται στην αξονική τομογραφία, συμπεριλαμβάνονται η υπόπυκνη απεικόνιση του εγκεφαλικού παρεγχύματος, η ανάπτυξη οιδήματος, η εξαφάνιση των αυλάκων και η υπέρπυκνη απεικόνιση των εγκεφαλικών αρτηριών, η οποία υποδηλώνει με υψηλή ειδικότητα την παρουσία θρόμβου εντός της αρτηρίας (12).

Η αξονική τομογραφία εγκεφάλου έχει υψηλή ειδικότητα σε ότι αφορά στην πρόωμη διάγνωση ισχαιμικών εγκεφαλικών βλαβών (11,13,14). Η ελάττωση της εγκεφαλικής αιματικής ροής, που απεικονίζεται στην αξονική τομογραφία αιμάτωσης (CT perfusion imaging), φαίνεται να σχετίζεται με επακόλουθη παρεγχυματική βλάβη (15,16).

Η ευαισθησία και ειδικότητα της αξονικής τομογραφίας και της μαγνητικής τομογραφίας κατά την οξεία φάση του ισχαιμικού επεισοδίου φαίνονται παρακάτω:

#### Διάγνωση ισχαιμικού και αιμορραγικού ΑΕΕ κατά την οξεία φάση

- CT εγκεφάλου

Ευαισθησία= 16%

Ειδικότητα= 96%

- MRI scan

Ευαισθησία= 83%

Ειδικότητα= 98%

#### Διάγνωση αιμορραγικού ΑΕΕ κατά την οξεία φάση

- CT εγκεφάλου

Ευαισθησία= 89%

Ειδικότητα= 100%

- MRI scan

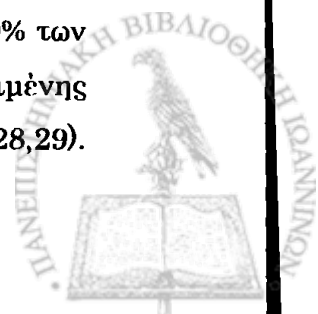




απαιτείται η διενέργεια μαγνητικής τομογραφίας τραχήλου με ακολουθίες T1 με καταστολή του σήματος του λίπους, έτσι ώστε να απεικονιστεί το ενδοτοιχωματικό αιμάτωμα.

Ο απεικονιστικός έλεγχος των αγγείων αποτελεί άμεση προτεραιότητα σε ασθενείς με Παροδικό Ισχαιμικό Επεισόδιο (ΠΙΕ) ή ήπιας βαρύτητας ΑΕΕ. Εξαιρετικά διαδεδομένες είναι οι μη επεμβατικές μέθοδοι απεικόνισης των αγγείων, όπως το έγχρωμο υπερηχογράφημα της εξωκράνιας και ενδοκράνιας μοίρας των αρτηριών του εγκεφάλου, η υπολογιστική αγγειογραφία (CTA) και η μαγνητική αγγειογραφία με τη χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας. Αυτές οι μέθοδοι είναι σχετικά ακίνδυνες σε αντίθεση με την ψηφιακή αγγειογραφία, που σχετίζεται με κίνδυνο εγκατάστασης ισχαιμικού ΑΕΕ σε ποσοστό 1-3% των ασθενών με συμπτωματική στένωση της καρωτίδας (23,24). Η διενέργεια ψηφιακής αφαιρετικής αγγειογραφίας είναι αναγκαία, όταν οι άλλες μέθοδοι δεν παρέχουν σαφή ευρήματα. Η στένωση της καρωτίδας μπορεί να απεικονιστεί υπερηχογραφικά ή μέσω μαγνητικής ή υπολογιστικής αγγειογραφίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα συστηματικών ανασκοπήσεων και μετα-αναλύσεων η μαγνητική αγγειογραφία με χορήγηση σκιαγραφικού αποτελεί την πλέον ευαίσθητη και ειδική μη-επεμβατική μέθοδο απεικόνισης των στενώσεων της καρωτίδας. Ακολουθείται από την υπερηχογραφία και την υπολογιστική αγγειογραφία. Η μαγνητική αγγειογραφία χωρίς χορήγηση σκιαγραφικού αποτελεί λιγότερο αξιόπιστη μέθοδο απεικόνισης αγγειακών βλαβών (25,26).

Σύμφωνα με μελέτες τα ΠΙΕ και τα ήπια ΑΕΕ του σπονδυλοβασικού συστήματος σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής (27). Η υπερηχογραφική μελέτη της εξωκράνιας μοίρας του σπονδυλοβασικού συστήματος είναι διαγνωστικά χρήσιμη ενώ η υπερηχογραφική εκτίμηση της ενδοκράνιας μοίρας έχει χαμηλή ειδικότητα και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Σε σύγκριση με άλλες απεικονιστικές μεθόδους, η υπερηχογραφία υπερέχει λόγω της ταχύτητας, της επαναληψιμότητας, του μη επεμβατικού χαρακτήρα και της δυνατότητας να εκτελείται οπουδήποτε με τη χρήση κινητών υπερηχογράφων. Η διακρανιακή υπερηχογραφία (Transcranial Doppler - TCD) είναι χρήσιμη για τη διάγνωση βλαβών των μεγάλων αρτηριών, που βρίσκονται κοντά στη βάση του κρανίου. Εκτιμάται όμως ότι το 7-20% των ασθενών με οξύ ΑΕΕ, και ιδιαίτερα άτομα μεγάλης ηλικίας ή συγκεκριμένης εθνικής προέλευσης, δε διαθέτουν κατάλληλο ακουστικό «παράθυρο» (28,29).



Το πρόβλημα αυτό μπορεί να περιοριστεί σημαντικά με τη χρήση σκιαγραφικών ουσιών, οι οποίες επιτρέπουν την επιπλέον μελέτη της εγκεφαλικής διάχυσης κατά την οξεία φάση (30,31,32) και τη συνεχή καταγραφή και παρακολούθηση (monitoring) των αιμοδυναμικών μεταβολών (33). Η συνδυασμένη χρήση υπερήχων και μαγνητικής αγγειογραφίας παρέχει εξαιρετικής αξιοπιστίας αποτελέσματα, τα οποία είναι συγκρίσιμα με εκείνα της ψηφιακής αφαιρετικής αγγειογραφίας (34). Η διακρανιακή υπερηχογραφία αποτελεί τη μοναδική μέθοδο ανίχνευσης εμβόλων εντός των ενδοκρανίων αρτηριών (35). Κάτι τέτοιο παρατηρείται πολύ συχνά σε ασθενείς με αθηρωματική νόσο των μεγάλων αγγείων. Η ανίχνευση εμβόλων σε ασθενείς με συμπτωματική στένωση της έσω καρωτίδας θεωρείται ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την εμφάνιση πρώιμης υποτροπής ή ΠΠΕ (36).



## **2. ΙΣΧΑΙΜΙΚΑ ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ (ΙΑΕΕ)**

### **2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ**

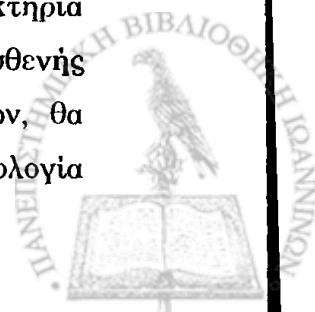
#### **2.1.1. ΘΡΟΜΒΩΤΙΚΑ ΑΕΕ**

Τα ισχαιμικά θρομβωτικά ΑΕΕ διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στη νόσο των μεγάλων αγγείων και στη νόσο των μικρών αγγείων. Ως νόσος των μεγάλων αγγείων χαρακτηρίζονται οι περιπτώσεις, όπου το ισχαιμικό ΑΕΕ προκαλείται από θρόμβωση των έσω καρωτιδών, των σπονδυλικών αρτηριών ή των αγγείων του κύκλου του Willis. Θρόμβωση σε μεγάλο αγγείο μπορεί να προκληθεί στα πλαίσια αθηρωμάτωσης, αγγειοσύσπασης, αορτικού και καρωτιδικού διχασμού, σε φλεγμονώδεις νόσους των αγγείων, όπως η αρτηρίτιδα Takayasu και η giant cell αρτηρίτιδα και σε μη φλεγμονώδεις αγγειοπάθειες όπως είναι η αγγειοπάθεια Moyamoya και η ινομυική δυσπλασία.

Στη νόσο των μικρών αγγείων υπάρχει προσβολή των μικρών διακλαδιών των κλάδων των αγγείων του εγκεφάλου, όπως είναι οι μικρότεροι κλάδοι από τα αγγεία του κύκλου του Willis, οι κλάδοι της σπονδυλικής και της βασικής αρτηρίας. Η θρόμβωση των μικρών αγγείων μπορεί να προκληθεί από λιποϋαλίνωση (κυρίως από την αυξημένη αρτηριακή πίεση) και από τη δημιουργία μικροαθηρωμάτων. Τα προκαλούμενα ισχαιμικά έμφρακτα από νόσο των μικρών αγγείων έχουν διάμετρο  $\leq 15$  mm και είναι γνωστά ως lacunars.

#### **2.1.2. ΕΜΒΟΛΙΚΑ ΑΕΕ**

Ως εμβολικά περιγράφονται τα ΑΕΕ, όπου ένα έμβολο φράζει μια αρτηρία του εγκεφάλου. Το έμβολο είναι συχνότερα ένας θρόμβος αίματος αλλά μπορεί να είναι επίσης λίπος, αέρας, καρκινικά κύτταρα ή μάζα από βακτήρια (π.χ. στην περίπτωση της βακτηριακής ενδοκαρδίτιδας). Όταν ένας ασθενής υποστεί εμβολικό ΑΕΕ, επειδή υπάρχει συγκεκριμένη πηγή εμβόλων, θα πρέπει να προσδιοριστεί η πηγή αυτή. Σε εμβολικό ΑΕΕ η συμπτωματολογία



και η σημειολογία εγκαθίσταται αιφνιδίως και έτσι αιφνιδίως μπορεί να υποχωρήσει, αν το έμβολο μετακινηθεί ή λυθεί. Τα έμβολα στην πλεονότητα των περιπτώσεων προέρχονται από την καρδιά (κυρίως επί κολπικής μαρμαρυγής) αλλά μπορεί να προέρχονται και από οπουδήποτε στο αρτηριακό δέντρο, όπως στις περιπτώσεις της παράδοξης εμβολής, όπου μια εν τω βάθει θρόμβωση μπορεί να προκαλέσει εμβολικό ΑΕΕ, εάν υπάρχει ανοιχτό ωοειδές τρήμα.

Γενικότερα τα καρδιακά αίτια εμβολής μπορούν να διαχωριστούν σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου (37). Ως υψηλού κινδύνου θεωρούνται οι περιπτώσεις κολπικής μαρμαρυγής, παροξυσμικής κολπικής μαρμαρυγής, κολπικού πτερυγισμού, ρευματικής νόσου της μιτροειδούς ή της αορτικής βαλβίδας, τεχνητών βαλβίδων, γνωστής ύπαρξης θρόμβων στην αριστερή κοιλία, πρόσφατου εμφράγματος του μυοκαρδίου, συμπτωματικής καρδιακής ανεπάρκειας με κλάσμα εξώθησης  $\leq 30\%$ , διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας, Lidman-Sacks ενδοκαρδίτιδας, βακτηριακής ενδοκαρδίτιδας, θηλωματώδους ινοελαστώματος, μυξώματος και πρόσφατης επέμβασης bypass (coronary artery bypass graft CABG). Ως χαμηλού κινδύνου εμβολογόνες εστίες θεωρούνται οι επασβεστώσεις των γλωχίνων της μιτροειδούς, το ανοιχτό ωοειδές τρήμα, το ανεύρυμα μεσοκολπικού διαφράγματος, η ανευρυσματική διάταση της αριστερής κοιλίας χωρίς την παρουσία θρόμβων, η ύπαρξη αθηρώματος στην ανιούσα αορτή ή στο αορτικό τόξο.

### **2.1.3. ΑΕΕ ΑΠΟ ΧΑΜΗΛΗ ΠΑΡΟΧΗ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Η χαμηλή ροή αίματος προς τον εγκέφαλο, μπορεί να προκληθεί από περικαρδίτιδα, καρδιακό επιπωματισμό, καρδιακή ανακοπή, αρρυθμία, συστηματική αιμορραγία και υπογκαιμία. Η μειωμένη παροχή επηρεάζει όλο τον εγκέφαλο, όμως οι μεθοριακές περιοχές, οι οποίες αρδεύονται από τελικούς κλάδους δύο γειτονικών μεγάλων αγγείων, γνωστές ως «watershed» περιοχές, επηρεάζονται περισσότερο. Η παροχή αίματος στις περιοχές αυτές μπορεί να μειωθεί σε τόσο δραστικά επίπεδα, που να προκληθεί μόνιμη βλάβη του εγκεφαλικού ιστού.

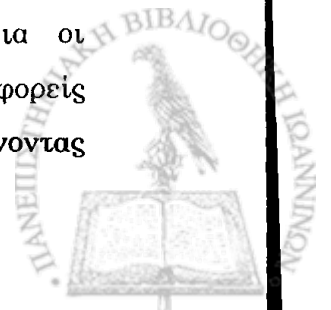


## 2.2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Ο εγκεφαλικός ιστός αρχίζει να υπολειτουργεί, αν στερηθεί οξυγόνου για περισσότερο από 60-90 δευτερόλεπτα. Αν παραμείνει χωρίς οξυγόνο για κάποια λεπτά μπορεί να προκληθεί μη αναστρέψιμη βλάβη, που οδηγεί σε καταστροφή εγκεφαλικού ιστού, δηλαδή σε δημιουργία ισχαιμικού εμφράκτου. Η αθηρωσκλήρωση μπορεί να μειώσει την παροχή αίματος λόγω της μείωσης του αυλού του αγγείου με τη δημιουργία των πλακών ή τη δημιουργία θρόμβων αίματος. Σε ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και σε άλλες καταστάσεις, όπως η κοιλιακή μαρμαρυγή, μπορούν να δημιουργηθούν μικρά έμβολα τα οποία θα αποφράξουν πιο περιφερικούς κλάδους. Στον εγκέφαλο υπάρχει αναπτυγμένη παράπλευρη κυκλοφορία, οπότε ανάλογα με το πώς αυτή μπορεί να αρδεύσει μια ισχαιμύσα περιοχή, μπορεί να αποφευχθεί η μόνιμη βλάβη. Έτσι σε άλλες περιπτώσεις και σε διαφορετικές περιοχές μπορεί να υπάρξει νέκρωση εγκεφαλικού ιστού ή κάποιες περιοχές ίσως μπορέσουν να διασωθούν.

Στα ισχαιμικά ΑΕΕ προκαλείται μείωση της παροχής αίματος σε μια περιοχή του εγκεφάλου, η οποία είναι η ισχαιμύσα περιοχή (ischemic cascade). Η περιοχή στην περιφέρεια της ισχαιμίας, που μπορεί να διασωθεί, ονομάζεται penumbra.

Καθώς το οξυγόνο και η γλυκόζη εξαντλούνται στην ισχαιμύσα περιοχή, η παραγωγή ενώσεων, όπως το τριφωσφορικό άλας αδενοσίνης (ATP), μειώνεται με αποτέλεσμα την αποτυχία των ενεργειακά εξαρτώμενων διαδικασιών (όπως η αντλία ιόντων) απαραίτητων για την επιβίωση των κυττάρων. Αυτό πυροδοτεί μια σειρά αλληλένδετων γεγονότων, που οδηγούν στην κυτταρική βλάβη και το θάνατο. Μια σημαντική αιτία της νευρωνικής βλάβης είναι η απελευθέρωση του γλουταμικού εξωκυττάρια. Η συγκέντρωση γλουταμικού στο εξωτερικό των κυττάρων του νευρικού συστήματος διατηρείται υπό κανονικές συνθήκες χαμηλή, από τους αποκαλούμενους μεταφορείς επαναπρόσληψης, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τις διαβαθμίσεις της συγκέντρωσης των ιόντων (κυρίως  $\text{Na}^+$ ) διαμέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Εντούτοις, το εγκεφαλικό επεισόδιο αποκόπτει τον ανεφοδιασμό του εγκεφάλου με οξυγόνο και γλυκόζη, που τροφοδοτούν τις ιονικές αντλίες, υπεύθυνες να διατηρούν τις ιονικές διαβαθμίσεις. Κατά συνέπεια οι διαμεμβρανικές ιονικές διαβαθμίσεις μειώνονται και οι μεταφορείς επαναπρόσληψης αντιστρέφουν την κατεύθυνσή τους απελευθερώνοντας



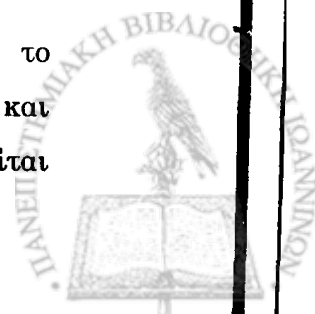


γλουταμικό στον εξωκυττάριο χώρο. Το γλουταμικό επενεργεί στους υποδοχείς των νευρικών κυττάρων (ειδικά υποδοχείς NMDA), προκαλώντας εισροή του ασβεστίου, που με τη σειρά του ενεργοποιεί τα ένζυμα που πέπτουν πρωτεΐνες, λιπίδια και πυρηνικό υλικό. Η εισροή ασβεστίου μπορεί επίσης να προκαλέσει ανεπάρκεια των μιτοχονδρίων, η οποία οδηγεί σε περαιτέρω ενεργειακή μείωση και προκαλεί το θάνατο των κυττάρων μέσω της απόπτωσης. Η ισχαιμία προκαλεί επίσης την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οι οποίες αντιδρούν και βλάπτουν κυτταρικά και εξωκυττάρια στοιχεία. Οι ελεύθερες ρίζες επίσης ενεργοποιούν άμεσα τα στοιχεία του καταρράκτη της απόπτωσης, με τη βοήθεια της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης.

Αυτές οι διαδικασίες είναι οι ίδιες για οποιοδήποτε τύπο ισχαιμικού ιστού και αναφέρονται συλλογικά ως ισχαιμικός καταρράκτης. Εντούτοις, ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα τρωτός στην ισχαιμία, δεδομένου ότι έχει μικρά αποθέματα ενέργειας και εξαρτάται απολύτως από τον αερόβιο μεταβολισμό, σε αντίθεση με τα περισσότερα όργανα.

Η επιβίωση του εγκεφάλου μπορεί να βελτιωθεί σε ένα ορισμένο βαθμό εάν μία ή περισσότερες από αυτές τις διαδικασίες παρεμποδιστούν. Φάρμακα που απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, εμποδίζουν την απόπτωση ή παρεμποδίζουν τους νευροδιαβιβαστές, παραδείγματος χάριν, έχει παρουσιαστεί πειραματικά να μειώνουν τον εγκεφαλικό θάνατο λόγω ισχαιμίας. Οι ενώσεις, που δρουν κατά αυτόν τον τρόπο, αναφέρονται ως νευροπροστατευτικές. Μέχρι σήμερα, οι κλινικές δοκιμές με τις νευροπροστατευτικές ενώσεις έχουν αποτύχει. Εκτός από τα επιβλαβή αποτελέσματα στα κύτταρα του εγκεφάλου, η ισχαιμία μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της δομικής ακεραιότητας των αιμοφόρων αγγείων του εγκεφάλου, εν μέρει μέσω της απελευθέρωσης των μεταλλοπρωτεασών, που είναι ασβέστο-εξαρτώμενα ένζυμα ψευδάργυρου και καταβολίζουν το κολλαγόνο, το υαλουρονικό οξύ και άλλα στοιχεία του συνδετικού ιστού. Άλλες πρωτεάσες συμβάλλουν επίσης σε αυτήν την διαδικασία. Η απώλεια της αγγειακής δομικής ακεραιότητας οδηγεί σε διακοπή του προστατευτικού αιματοεγκεφαλικού φραγμού, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του εγκεφαλικού οιδήματος, το οποίο επιδεινώνει περαιτέρω το εγκεφαλικό επεισόδιο.

Όπως συμβαίνει με οποιοδήποτε τύπο εγκεφαλικής βλάβης, το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται από την εγκεφαλική ισχαιμία και μπορεί κάτω από ορισμένες συνθήκες να επιδεινώσει τη βλάβη που προκαλείται



από την ισχαιμία. Παρεμπόδιση της απάντησης στη φλεγμονή έχει δοκιμασθεί πειραματικά, για να μειωθεί η βλάβη λόγω της εγκεφαλικής ισχαιμίας, αλλά όφελος δεν έχει αποδειχθεί από κλινικές μελέτες.

### **2.3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΙΑΕΕ**

Η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης θεωρούνται οι πλέον επιβαρυντικοί παράγοντες κινδύνου στην πρόκληση των ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών. Η υπέρταση ευθύνεται, ως προδιαθεσικός παράγοντας κινδύνου, για το μεγαλύτερο μέρος των ΑΕΕ (38). Η υπέρταση προκαλεί λειτουργικές και δομικές αλλαγές στα διάφορα όργανα, όπως είναι υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, προσβολή των νεφρών και αθηροσκλήρωση. Η αθηροσκλήρωση επηρεάζει συχνά τη στεφανιαία και την εγκεφαλική κυκλοφορία με επακόλουθο αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου και εγκεφαλικού επεισοδίου. Οι αυξημένες τιμές αρτηριακής πίεσης (> 120/80 mmHg) σχετίζονται ισχυρά και άμεσα με αυξημένη αγγειακή και γενική θνησιμότητα, χωρίς να αναφέρονται κάποιες συγκεκριμένες οριακές τιμές πίεσης (39).

Σε σχέση με το σακχαρώδη διαβήτη, οι πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη έχουν 2 ως 3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να υποστούν εγκεφαλικό επεισόδιο και συνήθως πάσχουν και από υπέρταση και δυσλιπιδαιμία. Ο εντατικός έλεγχος της νόσου μειώνει τις βλάβες των μικρών αγγείων, όπως η νεφροπάθεια και η αμφιβληστροειδοπάθεια, αλλά όχι τις βλάβες των μεγαλύτερων αγγείων που οδηγούν στα ΑΕΕ (40,41).

Οι υψηλές τιμές χοληστερόλης έχουν συσχετιστεί με την πρόκληση ισχαιμικών ΑΕΕ (42,43). Οι στατίνες μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ κατά 15%. Με δεδομένο ότι πρόσφατες μετα-αναλύσεις με άλλα φάρμακα που μειώνουν τη χοληστερόλη δεν μπόρεσαν να αναδείξουν ευεργετικά αποτελέσματα στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ΑΕΕ (44) φαίνεται ότι οι στατίνες δρουν και μέσω άλλων μηχανισμών στο ενδοθήλιο (45).

Μελέτες παρατήρησης απέδειξαν ότι το κάπνισμα αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εγκατάσταση ισχαιμικών ΑΕΕ και στα δύο φύλα (46,47,48,49,50,51). Το παθητικό κάπνισμα πιθανόν σχετίζεται με αυξημένο



κίνδυνο ΑΕΕ (52). Σύμφωνα με μια μετα-ανάλυση το κάπνισμα διπλασιάζει τον κίνδυνο ισχαιμικού ΑΕΕ (53).

Ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος (body mass index - BMI) σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ΑΕΕ στους άνδρες (54) και στις γυναίκες (55). Η συσχέτιση αυτή αποδίδεται εν μέρει στη συνύπαρξη αρτηριακής υπέρτασης και σακχαρώδους διαβήτη στους ασθενείς με αυξημένο BMI. Η παχυσαρκία, όπως εκφράζεται από την αυξημένη περιφέρεια της μέσης, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ΑΕΕ στους άντρες, όχι όμως και στις γυναίκες (56).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μετα-ανάλυσης τα σωματικά δραστήρια άτομα έχουν μικρότερο κίνδυνο θανάτου ή εγκατάστασης ΑΕΕ (RR 0.73; 95% CI 0.67-0.79). Παρομοίως, άτομα με μέτριο επίπεδο άσκησης παρουσιάζουν μικρότερο κίνδυνο από άτομα που δεν ασκούνται καθόλου (RR 0.80; 95% CI 0.74-0.86) (57).

Η βαριά κατανάλωση οινοπνεύματος (>60 g ημερησίως) αυξάνει τον κίνδυνο ισχαιμικού (RR 1.69; 95% CI 1.34-2.15) και αιμορραγικού ΑΕΕ (RR 2.18; 95% CI 1.48-3.20). Αντίθετα, η ήπια κατανάλωση (<12 g ημερησίως) σχετίζεται με ελάττωση τόσο του συνολικού κινδύνου εγκατάστασης ΑΕΕ (RR 0.83; 95% CI 0.75-0.91), όσο και του κινδύνου εγκατάστασης ισχαιμικού ΑΕΕ (RR 0.80; 95% CI 0.67-0.96) αλλά και η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (12-24 g ημερησίως) σχετίζεται με μείωση του κινδύνου ισχαιμικών ΑΕΕ (RR 0.72; 95% CI 0.57-0.91) (58). Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αλκοολούχα ποτά, το κόκκινο κρασί σχετίζεται με το χαμηλότερο κίνδυνο ΑΕΕ (59).

Σύμφωνα με μελέτες παρατήρησης η υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εγκατάστασης ΑΕΕ (RR 0.96 για κάθε επιπλέον αύξηση κατά 2 μερίδες ημερησίως; 95% CI 0.93-1.00) (60).

Στα ισχαιμικά ΑΕΕ η επίπτωση αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας (Πίνακας 2) και η επίδραση των προαναφερθέντων υπεύθυνων αιτιολογικών παραγόντων ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία (42).



Ηλικία	Λευκή φυλή		Μαύρη φυλή	
	Άνδρες	Γυναίκες	Άνδρες	Γυναίκες
45-54	1.4	0.8	2.1	2.5
55-64	2.6	1.6	4.9	4.6
65-74	6.7	4.2	10.4	9.8
75-84	11.8	11.3	23.3	13.5
85	16.8	16.5	24.7	21.8

Επίπτωση (κάθε 100.000 ανά έτος)

Πίνακας 2: Πιθανότητα πρόκλησης ΑΕΕ με την πρόοδο της ηλικίας

Τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ΑΕΕ (OR 1.19; 95% CI 1.05 - 1.31) (61). Πολλοί άλλοι παράγοντες, όπως οι αγγειίτιδες, το αντιφωσφολιπιδαιμικό σύνδρομο, η ημικρανία με αύρα, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η πολυκυτταραιμία, τα ρευματολογικά νοσήματα και οι διαταραχές της πήκτικότητας (61,62,63,64,65,66) σχετίζονται με αυξημένη επίπτωση ΙΑΕΕ. Χρήση φαρμάκων επίσης σχετίζεται με την πρόκληση ΑΕΕ, όπως τα συμπαθητικομιμητικά αλλά και οι αμφεταμίνες, που προκαλούν κυρίως αιμορραγικά ΑΕΕ (67,68). Λιγότερο αποδεδειγμένοι προδιαθεσικοί παράγοντες στην πρόκληση ΙΑΕΕ είναι η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (69), η χρήση αντισυλληπτικών φαρμάκων (70) και οι διαταραχές της αναπνευστικής λειτουργίας (71).

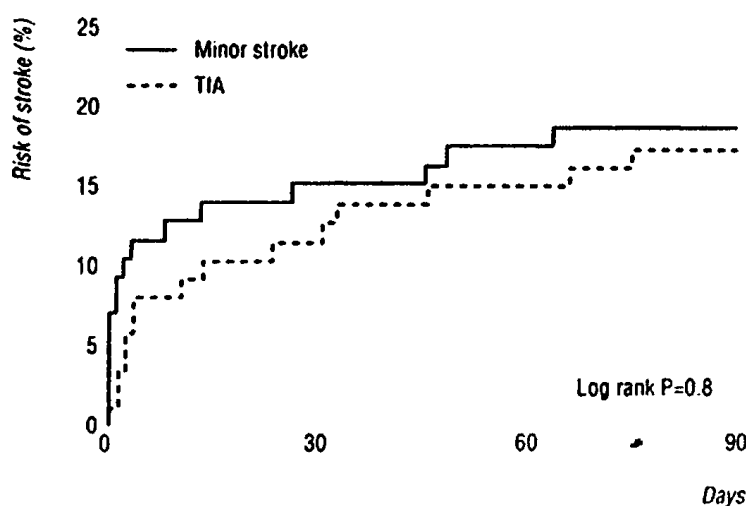
Επί πλέον, με δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία ότι το θετικό οικογενειακό ιστορικό αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου και ότι στους διδύμους η εμφάνιση ΑΕΕ στον ένα διπλασιάζει έως τετραπλασιάζει την πιθανότητα εμφάνισης και στον άλλο παρόμοιου επεισοδίου (72), αποδεικνύεται η αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών επιβαρυντικών παραγόντων. Έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι πληροφοριακοί γονιδιακοί πολυμορφισμοί, που έχουν λειτουργική σχέση με τα ΙΑΕΕ και την αθηρωμάτωση, και που σχετίζονται με τη θρομβοφιλία, την υπέρταση και τη φλεγμονή.



Σε σχέση με τα εμβολικά ΙΑΕΕ, η εμβολογόνος εστία μπορεί να βρίσκεται στην καρδιά, όπως συμβαίνει στην κολπική μαρμαρυγή, το ΟΕΜ, τη ρευματική βαλβιδοπάθεια, την προσθετική βαλβίδα, το ανοικτό ωοειδές τρήμα και τη βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα ή σε άλλο αγγείο, όπως είναι η καρωτίδα ή το αορτικό τόξο.

Το προηγούμενο ΑΕΕ ή το παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο (ΠΙΕ) αυξάνει επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης νέου ΙΑΕΕ (73) (Γράφημα 3).

## OXVASC – Stroke Risk following TIA

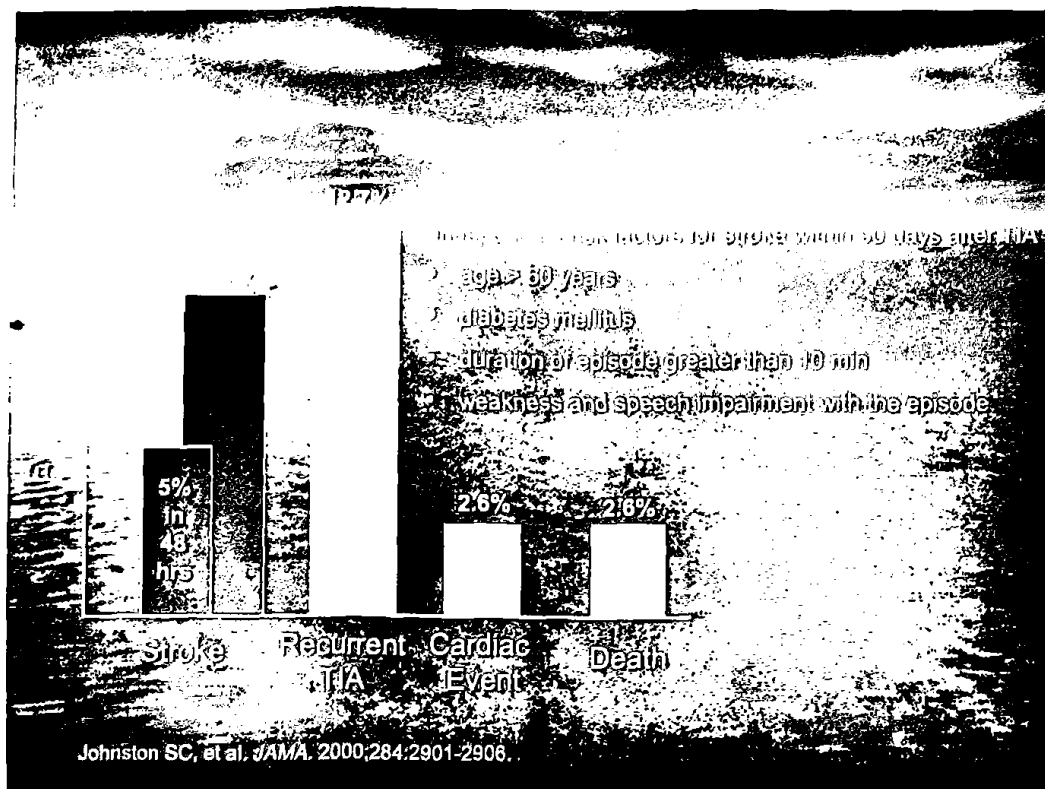


Rothwell et al, Lancet

**Γράφημα 3: Κίνδυνος εμφάνισης ΑΕΕ μετά από ΠΙΕ**

Σε σχέση με το ΠΙΕ, ως ΠΙΕ ορίζεται με το νεότερο ορισμό της EUSI, η νευρολογική δυσλειτουργία διάρκειας <60min, που οφείλεται σε εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία και δεν έχει αποδειχθεί έμφρακτο με εργαστηριακές μεθόδους. Μετά από κάθε ΠΙΕ ο κίνδυνος εμφάνισης ΑΕΕ είναι σημαντικός και αυξάνεται με την ηλικία, όταν ο ασθενής είναι μεγαλύτερος των 60 ετών, με την παρουσία σακχαρώδη διαβήτη, τη διάρκεια του ΠΙΕ>10 λεπτών και την εμφάνιση κινητικού ελλείμματος ή διαταραχών του λόγου κατά τη διάρκεια του επεισοδίου του ΠΙΕ (74) (Γράφημα 4).





*Γράφημα 4: Πιθανότητα εμφάνισης ΑΕΕ μετά από ΠΙΕ*

## 2.4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ- ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Το σύνθημα “time is brain” (ο χρόνος σημαίνει εγκέφαλο) σημαίνει ότι κάθε περίπτωση ΑΕΕ θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ως μια ιατρικώς επείγουσα κατάσταση. Η αποφυγή οποιασδήποτε καθυστέρησης θα πρέπει να αποτελεί το βασικό στόχο κατά την προνοσοκομειακή φάση αντιμετώπισης ενός οξέος ΑΕΕ. Σημαντικό ρόλο για την επίτευξη του στόχου αυτού παίζουν η έγκαιρη αναγνώριση και αξιολόγηση των συμπτωμάτων ενός ΑΕΕ από τον ίδιο τον ασθενή και τους συγγενείς του, η πρώτη επαφή με τον ιατρό και το μέσο μεταφοράς στο νοσοκομείο. Παρακάτω αναγράφονται οι οδηγίες της ESU για την αντιμετώπιση των ΑΕΕ πριν την έλευσή τους στο νοσοκομείο:

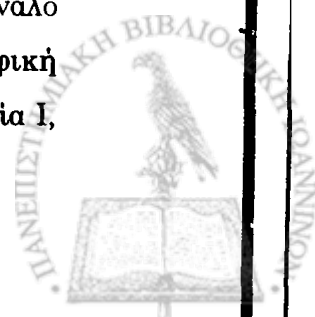
- Συνιστάται η άμεση κλήση του ΕΚΑΒ και η κατά προτεραιότητα διεκπεραίωση ασθενών με ΑΕΕ (Κατηγορία II, Επίπεδο Β).
- Συνιστάται η άμεση ειδοποίηση του νοσοκομείου υποδοχής του ασθενούς και η κατά προτεραιότητα μεταφορά του ασθενούς σε αυτό (Κατηγορία III, Επίπεδο Β).



- Οι ασθενείς με πιθανό ΑΕΕ πρέπει να μεταφέρονται άμεσα στην πλησιέστερη Μονάδα Αντιμετώπισης ΑΕΕ (stroke unit), η οποία και έχει τη δυνατότητα ταχείας θεραπευτικής παρέμβασης (Κατηγορία III, Επίπεδο Β).
- Οι τραυματιοφορείς και το πλήρωμα του ασθενοφόρου πρέπει να είναι εκπαιδευμένοι, ώστε να αναγνωρίζουν τα ΑΕΕ με τη βοήθεια απλών διαγνωστικών μεθόδων (Face-Arm-Speech-Test) (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η αεροδιακομιδή ασθενών από απομακρυσμένες, αγροτικές και νησιωτικές περιοχές, έτσι ώστε περισσότεροι ασθενείς να έχουν πρόσβαση στη θεραπεία (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Συνιστάται η χρήση συστημάτων τηλεϊατρικής σε απομακρυσμένες και αγροτικές περιοχές, έτσι ώστε περισσότεροι ασθενείς να έχουν πρόσβαση στη θεραπεία (Κατηγορία II, επίπεδο Β).
- Συνιστάται η χωρίς καθυστέρηση μεταφορά ασθενών με πιθανό ΠΠΕ σε νοσοκομείο με Μονάδα Αντιμετώπισης ΑΕΕ (stroke unit), που έχει τη δυνατότητα εξειδικευμένης διαγνωστικής προσέγγισης και άμεσης θεραπείας (Κατηγορία III, Επίπεδο Β).

Κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο:

- Συνιστάται η άμεση κλινική εκτίμηση των ασθενών με ΑΕΕ στο τμήμα επειγόντων περιστατικών, η ταχεία διεκπεραίωση του εργαστηριακού και απεικονιστικού ελέγχου, η ακριβής διάγνωση και η χορήγηση της ενδεδειγμένης θεραπευτικής αγωγής, όσο το δυνατόν γρηγορότερα (Κατηγορία III, Επίπεδο Β).
- Σε ασθενείς με οξύ ΑΕΕ ή ΠΠΕ συνιστάται άμεση εκτίμηση της κλινικής κατάστασης και των ζωτικών παραμέτρων, καθώς και βασικός αιματολογικός έλεγχος (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Συνιστάται καταγραφή της αρτηριακής πίεσης.
- Συνιστάται μέτρηση του κορεσμού οξυγόνου με τη χρήση υπέρυθρης παλμικής οξυμετρίας, εφόσον αυτή είναι διαθέσιμη.
- Συνιστάται εκτίμηση της δυσφαγίας / δυσκαταποσίας, κατά προτίμηση με τη χρήση σταθμισμένων μεθόδων (75).
- Απαιτείται τοποθέτηση φλεβοκαθετήρα.
- Σε όλους τους ασθενείς με οξύ ΑΕΕ ή ΠΠΕ συνιστάται 12-κάναλο ηλεκτροκαρδιογράφημα. Επιπλέον, συνεχής ηλεκτροκαρδιογραφική καταγραφή συνιστάται σε ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ ή ΠΠΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).



- Σε ασθενείς με ΑΕΕ ή ΠΠΕ που προσέρχονται μετά την πάροδο της οξείας φάσης, συνιστάται ο έλεγχος με 24ωρη ηλεκτροκαρδιογραφική καταγραφή (Holter-ΗΚΓ), εφόσον υπάρχει η υποψία αρρυθμιών ή δεν έχει διαπιστωθεί το αίτιο του ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Η εξέταση πρέπει να συμπληρώνεται με τη λήψη ιατρικού ιστορικού, που θα λαμβάνει υπόψη αγγειακούς παράγοντες κινδύνου, καρδιακά νοσήματα, λήψη φαρμάκων και καταστάσεις που προδιαθέτουν σε αιμορραγικές επιπλοκές ή μπορούν να μιμηθούν κλινικά την εικόνα ΑΕΕ. Νεαροί ασθενείς πρέπει να ερωτώνται για τη χρήση τοξικών ουσιών ή αντισυλληπτικών και για ιστορικό λοίμωξης, τραυματισμού ή ημικρανίας.
- Ο υπερηχοκαρδιογραφικός έλεγχος συνιστάται σε επιλεγμένους ασθενείς (Επίπεδο III, Κατηγορία Β).

Υπερηχοκαρδιογράφημα απαιτείται σε ασθενείς με:

- προφανή καρδιακή νόσο βάσει του ατομικού ιστορικού, της κλινικής εξέτασης ή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος
- υποψία καρδιοεμβολικής αιτιολογίας ΑΕΕ (π.χ. έμφρακτα σε διαφορετικά πεδία άρδευσης)
- υποψία νόσου της αορτής
- υποψία παράδοξης εμβολής
- απουσία άλλων πιθανών αιτιών, που προκαλούν ΑΕΕ.

Το διωσοφάγειο υπεροχοκαρδιογράφημα υπερτερεί σε ότι αφορά στην απεικόνιση του αορτικού τόξου, του αριστερού κόλπου και του μεσοκοιλιακού διαφράγματος και καθιστά δυνατή την εκτίμηση του κινδύνου περαιτέρω θρομβοεμβολικών συμβάντων σε ασθενείς με κοιλιακή μαρμαρυγή (76).

#### Διαγνωστική απεικόνιση

- Σε ασθενείς με πιθανό ΠΠΕ ή ΑΕΕ συνιστάται η άμεση διενέργεια αξονικής τομογραφίας εγκεφάλου (Κατηγορία I, Επίπεδο Α) ή εναλλακτικά μαγνητικής τομογραφίας εγκεφάλου (Κατηγορία II, Επίπεδο Α).
- Εφόσον γίνει μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου στην οξεία φάση συνιστάται και η λήψη ακολουθιών διάχυσης (diffusion weighted imaging - DWI) και ακολουθιών T2\* (T2\* gradient echo) (Κατηγορία II, Επίπεδο Α).





- Σε ασθενείς με ΠΠΕ, ήπιο ΑΕΕ ή ταχεία κλινική βελτίωση συνιστάται ο άμεσος απεικονιστικός έλεγχος των αγγείων (υπερηχογράφημα, CT-αγγειογραφία ή MR αγγειογραφία) (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).

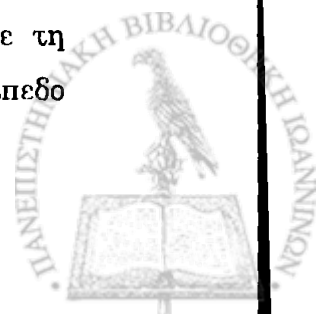
Συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι εξετάσεις που πρέπει να γίνουν σε ασθενείς με ΑΕΕ.

Έλεγχος ασθενών με ΑΕΕ	
1	Απεικόνιση του εγκεφάλου: αξονική τομογραφία ή μαγνητική τομογραφία
2	Ηλεκτροκαρδιογράφημα
3	Εργαστηριακές εξετάσεις: γενική αίματος, αιμοπετάλια, χρόνος προθρομβίνης, INR, PTT ηλεκτρολύτες αίματος, σάκχαρο αίματος ΤΚΕ, CRP έλεγχος ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας
4	Εξωκρανιακή και διακρανιακή υπερηχογραφία
5	Μαγνητική ή υπολογιστική αγγειογραφία
6	Μαγνητική τομογραφία με ακολουθίες διάχυσης και αιμάτωσης (diffusion & perfusion) ή αξονική τομογραφία αιμάτωσης
7	Υπερηχοκαρδιογράφημα (διαθωρακικό και / ή διοισοφάγειο)
8	Ακτινογραφία θώρακος
9	Παλμική οξυμετρία και ανάλυση αερίων αρτηριακού αίματος
10	Οσφυονωτιαία παρακέντηση
11	Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα
12	Τοξικολογικός έλεγχος
13	Έλεγχος θρομβοφιλίας Μεταλλάξεις των παργόντων FII, FV, και FVIII Πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S, Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, d-dimers, ομοκυστεΐνη
14	Έλεγχος εγκεφαλονωτιαίου υγρού, ανοσολογικός έλεγχος, ειδικός έλεγχος για HIV, σύφιλη, μπορελίοση, φυματίωση και μυκητιάσεις, τοξικολογικός έλεγχος. Καλλιέργεια αίματος
15	Γενετικός έλεγχος



### Αντιμετώπιση στην οξεία φάση

- Σε ασθενείς με σημαντικό νευρολογικό έλλειμμα συνιστάται η ανά διαστήματα εκτίμηση της νευρολογικής κλινικής κατάστασης και η παρακολούθηση των σφύξεων, της αρτηριακής πίεσης, της θερμοκρασίας και του κορεσμού οξυγόνου κατά τις πρώτες 72 ώρες (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η χορήγηση οξυγόνου, εφόσον ο κορεσμός οξυγόνου είναι χαμηλότερος του 95% (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η τακτική παρακολούθηση του ισοζυγίου υγρών και ηλεκτρολυτών σε ασθενείς με βαρύ ΑΕΕ ή δυσκαταποσία (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η χορήγηση φυσιολογικού ορού (0.9%) για ενυδάτωση κατά το πρώτο 24ωρο από την εγκατάσταση του ΑΕΕ (Κατηγορία IV).
- Δε συνιστάται η ελάττωση της αρτηριακής πίεσης μετά από οξύ ΑΕΕ (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η προσεκτική και βραδεία ελάττωση της αρτηριακής πίεσης σε ασθενείς με κατ' επανάληψιν ιδιαίτερα υψηλές τιμές πίεσης (>220/120 mmHg), με βαριά καρδιακή ανεπάρκεια, διαχωρισμό της αορτής ή υπερτασική εγκεφαλοπάθεια (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η αποφυγή της απότομης ελάττωσης της αρτηριακής πίεσης (Κατηγορία II, Επίπεδο G).
- Συνιστάται η χορήγηση κολλοειδών διαλυμάτων σε ασθενείς με οξύ ΑΕΕ, που παρουσιάζουν χαμηλή αρτηριακή πίεση λόγω υποογκαιμίας ή σχετιζόμενη νευρολογική επιδείνωση (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης αίματος (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η ρύθμιση των αυξημένων τιμών γλυκόζης >180 mg/dl (>10 mmol/l) με χρήση ινσουλίνης (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η αντιμετώπιση της σοβαρής υπογλυκαιμίας (<50 mg/dl (<2.8 mmol/l)) με την ενδοφλέβια χορήγηση δεξτρόζης ή διαλύματος γλυκόζης συγκέντρωσης 10–20% (Κατηγορία IV).
- Σε περίπτωση πυρετού (θερμοκρασία >37.5°C) πρέπει να γίνει άμεση διερεύνηση για πιθανή εστία λοίμωξης (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η αντιμετώπιση του πυρετού (θερμοκρασία >37.5°C) με τη χορήγηση παρακεταμόλης και κρύων επιθεμάτων (Κατηγορία III, Επίπεδο G).



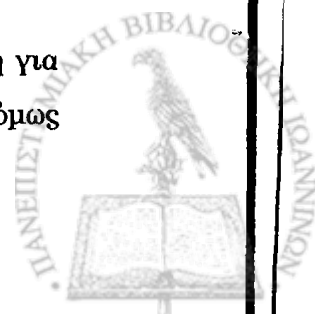
- Συνιστάται η αποφυγή προφυλακτικής χορήγησης αντιβιοτικών σε μη ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Η νευρολογική κατάσταση μπορεί να παρακολουθείται και να καταγράφεται με τη χρήση σταθμισμένων νευρολογικών κλιμάκων, όπως είναι η NIH Stroke Scale, η Scandinavian Stroke Scale και η Modified Rankin Scale (77,78).

### Θρομβόλυση

Οι ασθενείς που φτάνουν στο νοσοκομείο εντός 3 ωρών από την εγκατάσταση των συμπτωμάτων θεωρούνται δυνητικά υποψήφιοι για ενδοφλέβια χορήγηση θρομβόλυσης (79). Η αξονική τομογραφία εγκεφάλου θεωρείται συνήθως επαρκής για την απόφαση χορήγησης θρομβολυτικής θεραπείας. Οι ασθενείς που φτάνουν στο νοσοκομείο μετά την πάροδο 3 ωρών από την εγκατάσταση του ΑΕΕ θεωρούνται υποψήφιοι για συμμετοχή σε κλινικές μελέτες, που εξετάζουν την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της θρομβόλυσης μετά την πάροδο του 3ωρου χρονικού διαστήματος ή που εξετάζουν άλλες πειραματικές μεθόδους αποκατάστασης της αιματικής ροής.

Η εντός των πρώτων 3 ωρών παρουσία στην αξονική τομογραφία σημείων ενδεικτικών πρόωμης ισχαιμικής βλάβης δε σημαίνει απαραίτητως και την εξαίρεση των ασθενών αυτών από τη χορήγηση θρομβόλυσης. Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι οι ασθενείς που παρουσιάζουν υπόπυκνη ισχαιμική βλάβη μεγαλύτερης έκτασης από το 1/3 του πεδίου άρδευσης της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας πιθανόν να ωφελούνται λιγότερο από τη χορήγηση θρομβόλυσης (79,80,81,82,83).

- Συνιστάται η εντός 3 ωρών από την εγκατάσταση ισχαιμικού ΑΕΕ ενδοφλέβια χορήγηση rtPA (0.9 mg/kg σωματικού βάρους, μέγιστη δόση 90 mg). Το 10% της συνολικής δόσης χορηγείται εφάπαξ και το υπόλοιπο στάγδην εντός 60 λεπτών (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Η ενδοφλέβια χορήγηση rtPA μπορεί να ωφελήσει ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ και μετά την πάροδο των πρώτων 3 ωρών από την εγκατάσταση του ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο B). Συνιστάται όμως η αποφυγή της υπέρβασης αυτού του χρονικού ορίου στην καθημερινή κλινική πρακτική.
- Η χρήση σύνθετων απεικονιστικών κριτηρίων μπορεί να είναι χρήσιμη για την επιλογή ασθενών που θα λάβουν θρομβολυτική αγωγή. Δεν έχει όμως ένδειξη στην καθημερινή κλινική πρακτική (Επίπεδο III, Επίπεδο G).



- Συνιστάται η ελάττωση των αυξημένων τιμών αρτηριακής πίεσης σε επίπεδα κάτω των 185/110 mmHg πριν από τη χορήγηση θρομβολυτικής θεραπείας (Επίπεδο IV).
- Μπορεί να χορηγηθεί rtPA ενδοφλεβίως σε ασθενείς που εκδήλωσαν επιληπτικές κρίσεις κατά την εγκατάσταση του ΑΕΕ, εφόσον το νευρολογικό έλλειμμα σχετίζεται με την οξεία εγκεφαλική ισχαιμία (Κατηγορία IV)..
- Μπορεί επίσης να χορηγηθεί rtPA ενδοφλεβίως σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 18 και άνω των 80 ετών, παρά το γεγονός ότι κάτι τέτοιο δεν περιλαμβάνεται στην ισχύουσα Ευρωπαϊκή άδεια του φαρμάκου (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Συνιστάται ως εναλλακτική λύση η ενδοαρτηριακή θρομβόλυση για την αντιμετώπιση της οξείας απόφραξης της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας εντός χρονικού διαστήματος 6 ωρών (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Η ενδοαρτηριακή θρομβόλυση συνιστάται σε επιλεγμένους ασθενείς για την αντιμετώπιση της οξείας απόφραξης της βασικής αρτηρίας (Κατηγορία III, Επίπεδο B).
- Η ενδοφλέβια θρομβόλυση αποτελεί αποδεκτή εναλλακτική λύση για την απόφραξη της βασικής αρτηρίας ακόμη και μετά την πάροδο 3 ωρών (Κατηγορία III, Επίπεδο B).

#### Αντιαιμοπεταλιακή – Αντιπηκτική θεραπεία κατά την οξεία φάση

- Συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης (160–325 mg δόση εφόδου) εντός 48 ωρών από την εγκατάσταση ισχαιμικού ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται η αποφυγή χορήγησης ασπιρίνης ή άλλης αντιθρομβωτικής αγωγής εντός του πρώτου 24ωρου μετά από θρομβόλυση (Κατηγορία IV).
- Δε συνιστάται η χορήγηση άλλων αντιαιμοπεταλιακών ουσιών (σε συνδυασμό ή ως μονοθεραπεία) στην οξεία φάση ισχαιμικού ΑΕΕ (Κατηγορία III, Επίπεδο G). Τα αποτελέσματα δύο μεγάλων, τυχαιοποιημένων, μη τυφλών μελετών παρέμβασης αποδεικνύουν ότι η χορήγηση ασπιρίνης είναι ασφαλής και αποτελεσματική εφόσον ξεκινήσει εντός 48 ωρών από την εγκατάσταση του ΑΕΕ. Η χρήση κλοπιδογρέλης, διπυριδαμόλης ή συνδυασμού αντιαιμοπεταλιακών ουσιών στην οξεία φάση του ισχαιμικού ΑΕΕ δεν έχει μελετηθεί.



- Δε συνιστάται η χορήγηση αναστολέων της γλυκοπρωτεΐνης IIb-IIIa (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Δε συνιστάται η χορήγηση ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους ή ηπαρινοειδών για την αντιμετώπιση ασθενών με οξύ ισχαιμικό ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Επί του παρόντος, δε συνιστάται η χορήγηση νευροπροστατευτικών ουσιών για την αντιμετώπιση ισχαιμικών ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο A).

### Εγκεφαλικό οίδημα και αυξημένη ενδοκράνια πίεση

- Συνιστάται η χειρουργική αποσυμπιεστική θεραπεία εντός 48 ωρών από την εγκατάσταση ΑΕΕ σε ασθενείς κάτω των 60 ετών με εξελισσόμενο κακόηθες έμφρακτο της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται η προεγχειρητική χορήγηση οσμωτικής θεραπείας για την αντιμετώπιση της αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης πριν τη χειρουργική επέμβαση (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Δεν μπορεί να δοθεί κάποια οδηγία σχετικά με την θεραπευτική υποθερμία σε ασθενείς με χωροκατακτητικά έμφρακτα (Κατηγορία IV).
- Μπορεί να ληφθεί υπόψιν το ενδεχόμενο τοποθέτησης παροχέτευσης ή χειρουργικής αποσυμπίεσης σε ασθενείς με εκτεταμένα έμφρακτα της παρεγκεφαλίδας που συμπιέζουν το στέλεχος του εγκεφάλου (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Η στοιχειώδης αντιμετώπιση περιλαμβάνει την ανόρθωση της κεφαλής σε γωνία μέχρι 30°, την αποφυγή επώδυνων ερεθισμάτων, τη χορήγηση αναλγητικών, την επαρκή οξυγόνωση και τη ρύθμιση της θερμοκρασίας σώματος.
- Η ήπια υποθερμία (π.χ. θερμοκρασία εγκεφάλου μεταξύ 32-33°C) μειώνει τη θνησιμότητα σε ασθενείς με βαριά έμφρακτα της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας. Κατά τη φάση της επαναθέρμανσης είναι όμως πιθανόν να προκληθούν σοβαρές επιπλοκές, όπως υποτροπιάζουσες κρίσεις ενδοκράνιας υπέρτασης (84,85).

### Λοιπή Αντιμετώπιση

- Συνιστάται η αντιμετώπιση των λοιμώξεων μετά από ΑΕΕ με τη χορήγηση κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής (Κατηγορία IV).

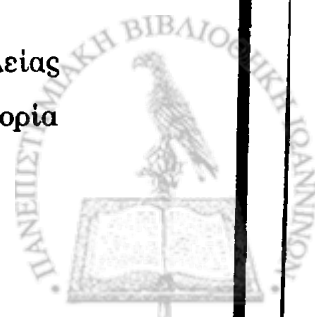


- Δε συνιστάται η προφυλακτική χορήγηση αντιβιοτικών (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Συνιστάται η ταχεία ενυδάτωση και η χρήση ειδικών καλτσών συμπίεσης για την αποφυγή φλεβικών θρομβεμβολών (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η ταχεία κινητοποίηση των ασθενών, ώστε να προληφθούν επιπλοκές όπως η πνευμονία λόγω εισρόφησης, η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και οι κατακλίσεις (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η υποδόρια χορήγηση χαμηλών δόσεων ηπαρίνης ή ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για πνευμονική εμβολή ή εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται η χορήγηση αντιεπιληπτικών για την αποφυγή υποτροπής επιληπτικών κρίσεων μετά το ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Δε συνιστάται η προφυλακτική χορήγηση αντιεπιληπτικών σε ασθενείς με πρόσφατο ΑΕΕ, που δεν έχουν παρουσιάσει επιληπτικές κρίσεις (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η εκτίμηση του κινδύνου πτώσεων σε όλους τους ασθενείς με ΑΕΕ (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής πλούσιων σε Ασβέστιο και Βιταμίνη D σε ασθενείς με ΑΕΕ και αυξημένο κίνδυνο πτώσεων (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Συνιστάται η χορήγηση διφωσφονικών (alendronate, etidronate και risedronate) σε γυναίκες με ιστορικό καταγμάτων (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Συνιστάται η εκτίμηση και αντιμετώπιση της ακράτειας ούρων από ειδικούς (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Συνιστάται η εκτίμηση της ικανότητας κατάποσης. Δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία που να τεκμηριώνουν τη σύσταση κάποιας ειδικής θεραπευτικής προσέγγισης (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Συνιστάται η από του στόματος χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής μόνο σε υποσιτισμένους ασθενείς χωρίς δυσφαγία (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Συνιστάται η έναρξη σίτισης μέσω ρινογαστρικού σωλήνα εντός 48 ωρών σε ασθενείς με ΑΕΕ και διαταραχές της κατάποσης (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Δε συνιστάται η γαστροστομία σε ασθενείς με ΑΕΕ πριν την πάροδο 2 εβδομάδων (Κατηγορία II, Επίπεδο B).



### Θεραπεία αποκατάστασης

- Συνιστάται η μεταφορά ασθενών με ΑΕΕ σε Μονάδες Αντιμετώπισης ΑΕΕ προκειμένου να λάβουν συντονισμένη πολυδύναμη θεραπεία αποκατάστασης (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Συνιστάται η ταχεία έναρξη της θεραπείας αποκατάστασης (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Σε σταθεροποιημένους ασθενείς με ήπιο ή μέτριο κλινικό έλλειμμα συνιστάται η ταχεία έξοδος από το νοσοκομείο, εφόσον στη συνέχεια υπάρχει η δυνατότητα παροχής θεραπείας αποκατάστασης από μια πολυδύναμη ομάδα ειδικών σε θέματα ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Συνιστάται η συνέχιση της θεραπείας αποκατάστασης και μετά την έξοδο του ασθενούς από το νοσοκομείο για ένα έτος από την εγκατάσταση του ΑΕΕ (Κατηγορία II, Επίπεδο Α).
- Συνιστάται η αύξηση της διάρκειας και η εντατικοποίηση της θεραπείας αποκατάστασης (Κατηγορία II, Επίπεδο Β).
- Συνιστάται φυσιοθεραπεία, αν και παραμένει αδιευκρίνιστο ποια είναι η ιδανική μέθοδος (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Συνιστάται εργοθεραπεία, αν και παραμένει αδιευκρίνιστο ποια είναι η ιδανική μέθοδος (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Συνιστάται η εκτίμηση των ελλειμμάτων επικοινωνίας. Δεν υπάρχουν όμως αρκετά στοιχεία που να υποστηρίζουν τη σύσταση για κάποια ειδική θεραπεία (Κατηγορία III, Επίπεδο).
- Συνιστάται η πληροφόρηση των ασθενών και των φροντιστών τους, αν και δεν έχει τεκμηριωθεί η σημασία της χρήσης των υπηρεσιών ενός ειδικού συνδέσμου από το σύνολο των ασθενών με ΑΕΕ (Κατηγορία II, Επίπεδο Β).
- Συνιστάται η θεραπεία αποκατάστασης σε όλους τους ασθενείς με ΑΕΕ. Δεν υπάρχουν όμως στοιχεία για την ενδεδειγμένη προσέγγιση ασθενών με βαριά αναπηρία (Κατηγορία II, Επίπεδο Β).
- Αν και η εκτίμηση τυχόν γνωστικών ελλειμμάτων είναι επιθυμητή, δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία, που να υποστηρίζουν τη σύσταση για κάποια ειδική θεραπεία (Κατηγορία I, Επίπεδο Α)
- Συνιστάται η παρακολούθηση των ασθενών κατά τη διάρκεια της νοσηλείας και μετά από αυτή για το ενδεχόμενο εμφάνισης κατάθλιψης (Κατηγορία IV, Επίπεδο Β).



- Συνιστώνται φαρμακευτικές και μη φαρμακευτικές παρεμβάσεις για τη βελτίωση της διάθεσης (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χορήγησης φαρμακευτικής αγωγής για την αντιμετώπιση της ευσυγκινησίας (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Συνιστάται η χορήγηση τρικυκλικών και αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε επιλεγμένους ασθενείς για την αντιμετώπιση του νευροπαθητικού πόνου μετά από ΑΕΕ (Κατηγορία III, Επίπεδο B).
- Αν και τα λειτουργικά οφέλη παραμένουν ασαφή, συνιστάται η χορήγηση αλαντικής τοξίνης για την αντιμετώπιση της σπαστικότητας μετά από ΑΕΕ (Κατηγορία III, Επίπεδο B).
- Η λογοθεραπεία μπορεί να βελτιώσει την κατάποση και να βοηθήσει στην ικανότητα επικοινωνίας του ασθενούς (Κατηγορία I, Επίπεδο A).

## **2.5. ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ**

### **2.5.1. ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ**

Η πρωτογενής πρόληψη είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματική από τη δευτερογενή, με βάση το «number needed to treat» για να αποφευχθεί ένα ΑΕΕ σε ένα χρόνο (86). Νεότερες οδηγίες αναφέρονται ακριβώς στις ενδείξεις της πρωτογενούς πρόληψης (87). Η ασπιρίνη φαίνεται να προστατεύει από ένα πρώτο ΑΕΕ σε ασθενείς που έχουν υποστεί ΟΕΜ (88).

Συνοπτικά αυτά, που θα πρέπει να γίνονται σε επίπεδο πρωτογενούς πρόληψης είναι:

- Ρύθμιση της υψηλής αρτηριακής πίεσης με στόχο την επίτευξη φυσιολογικών τιμών (120/80 mmHg) με την αλλαγή του τρόπου ζωής ή τη λήψη της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Σε ασθενείς με οριακές τιμές αρτηριακής πίεσης (120-139/80-90 mmHg) και καρδιακή ανεπάρκεια, έμφραγμα του μυοκαρδίου, σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια νεφρική ανεπάρκεια συνιστάται η χορήγηση αντιυπερτασικής φαρμακευτικής αγωγής (Κατηγορία I, Επίπεδο A).

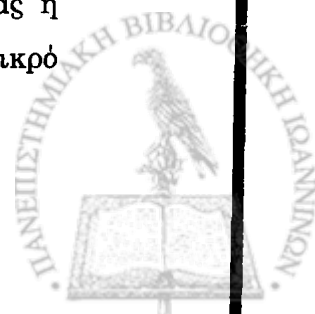




- Συνιστάται η ρύθμιση των αυξημένων τιμών σακχάρου με την αλλαγή του τρόπου ζωής ή τη λήψη της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής. (Κατηγορία IV, Επίπεδο G).
- Σε διαβητικούς ασθενείς πρέπει να γίνεται αυστηρή ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (Κατηγορία I, Επίπεδο A) με στόχο τιμές χαμηλότερες των 130/80 mmHg (Κατηγορία IV, Επίπεδο G). Στις περιπτώσεις που είναι εφικτό, πρέπει να χορηγούνται αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου ή ανταγωνιστές των υποδοχέων αγγειοτενσίνης (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Ρύθμιση των αυξημένων τιμών χοληστερίνης (π.χ. 150 mg/dl; 3.9 mmol/l) με την αλλαγή του τρόπου ζωής (Κατηγορία IV, Επίπεδο G) ή τη λήψη στατινών (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται η διακοπή του καπνίσματος (Κατηγορία III, Επίπεδο B).
- Συνιστάται η αποφυγή της μεγάλης κατανάλωσης αλκοολούχων ποτών (Κατηγορία III, Επίπεδο B).
- Συνιστάται η τακτική σωματική άσκηση (Κατηγορία III, Επίπεδο B).
- Συνιστάται διαίτα πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και φυτικές ίνες και με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι και κορεσμένα λιπαρά (Κατηγορία III, Επίπεδο B).
- Συνιστάται ελάττωση του σωματικού βάρους σε άτομα με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος (Κατηγορία III, Επίπεδο B).
- Δε συνιστάται η λήψη αντιοξειδωτικών βιταμινούχων συμπληρωμάτων διατροφής (Κατηγορία I, Επίπεδο A). Τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ΑΕΕ (OR 1.19; 95% CI 1.05 – 1.31) (61). Σύμφωνα με μια μετα-ανάλυση η συμπλήρωση φυλλικού οξέος, σε άτομα με υπερομοκυστεϊναιμία μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο ΑΕΕ (RR 0.82; 95% CI 0.68-1.00) (89).
- Δε συνιστάται η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης στα πλαίσια της πρωτογενούς πρόληψης ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο A).

#### Αντιθρομβωτική θεραπεία

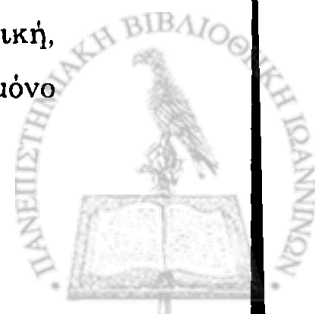
- Συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης σε χαμηλή δόση σε γυναίκες άνω των 45 ετών που δεν έχουν αυξημένο κίνδυνο ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας ή προβλήματα από το γαστρεντερικό. Το όφελος είναι όμως πολύ μικρό (Κατηγορία I, Επίπεδο A).



- Μπορεί να δοθεί η οδηγία για τη χορήγηση ασπιρίνης σε χαμηλή δόση σε άνδρες για την πρωτογενή πρόληψη εμφραγμάτων του μυοκαρδίου. Με τον τρόπο αυτό όμως μειώνεται κι ο κίνδυνος ισχαιμικού ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Δε συνιστάται η χορήγηση άλλων αντιαιμοπεταλιακών, πέραν της ασπιρίνης, για την πρωτογενή πρόληψη ΑΕΕ (Κατηγορία IV).
- Μπορεί να δοθεί η οδηγία για τη χορήγηση ασπιρίνης σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή ηλικίας κάτω των 65 ετών, χωρίς άλλους αγγειακούς παράγοντες κινδύνου (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Εφόσον δεν υπάρχει σχετική αντένδειξη, συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης ή αντιπηκτικών από του στόματος (INR= 2.0-3.0) σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή ηλικίας 65 έως 75 ετών χωρίς άλλους αγγειακούς παράγοντες κινδύνου (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Εφόσον δεν υπάρχει σχετική αντένδειξη, συνιστάται η χορήγηση αντιπηκτικών από του στόματος (INR= 2.0-3.0) σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή ηλικίας άνω των 75 ετών ή σε νεότερους ασθενείς με επιπλέον αγγειακούς παράγοντες κινδύνου, όπως υψηλή αρτηριακή πίεση, δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας ή σακχαρώδη διαβήτη (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή που δεν είναι σε θέση να λάβουν αντιπηκτικά από του στόματος (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται η μακροπρόθεσμη χορήγηση αντιπηκτικών από του στόματος σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή, που φέρουν προσθετική καρδιακή βαλβίδα. Οι τιμές στόχοι του INR εξαρτώνται από τον τύπο της βαλβίδας και δε θα πρέπει να είναι χαμηλότερες από INR= 2-3. (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης σε χαμηλή δόση σε ασθενείς με ασυμπτωματική στένωση >50% της έσω καρωτίδας για την ελάττωση του κινδύνου αγγειακών συμβάντων (Κατηγορία II, Επίπεδο B).

#### Χειρουργική της Καρωτίδας και Αγγειοπλαστική

- Δε συνιστάται καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή σε ασθενείς με ασυμπτωματική, σημαντικού βαθμού στένωση (NASCET 60-99%) της καρωτίδας, παρά μόνο σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο G).



- Δε συνιστάται η αγγειοπλαστική της καρωτίδας με ή χωρίς τοποθέτηση stent σε ασθενείς με ασυμπτωματική στένωση της καρωτίδας (Κατηγορία IV).

Η φαρμακευτική θεραπεία αποτελεί την καλύτερη λύση για την πλειονότητα των ασυμπτωματικών ασθενών με στένωση της καρωτίδας. Μόνο κέντρα με ποσοστά περιεγχειρητικών επιπλοκών κάτω του 3% θα πρέπει να προβαίνουν στη χειρουργική αντιμετώπιση ασυμπτωματικών ασθενών. Ασθενείς υψηλού κινδύνου για ΑΕΕ (άνδρες με στένωση >80% κι προσδόκιμο επιβίωσης μικρότερο της πενταετίας) μπορεί να έχουν όφελος από τη χειρουργική αντιμετώπιση σε κατάλληλο αγγειοχειρουργικό κέντρο (90,91). Ο καθορισμός του ποσοστού της αρτηριακής στένωσης γίνεται με βάση τα κριτήρια NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators) (92).

- Συνιστάται η χορήγηση ασπιρίνης στους ασθενείς πριν και μετά τη χειρουργική επέμβαση (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).

### **2.5.2. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ**

#### **Έλεγχος των παραγόντων κινδύνου**

- Συνιστάται ο τακτικός έλεγχος της αρτηριακής πίεσης. Η ελάττωση της αρτηριακής πίεσης συνιστάται μετά την πάροδο της οξείας φάσης, ακόμη και σε ασθενείς με φυσιολογικές τιμές πίεσης (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Συνιστάται ο τακτικός έλεγχος των τιμών σακχάρου αίματος. Συνιστάται η αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη με αλλαγή του τρόπου ζωής και εξατομικευμένη φαρμακευτική αγωγή (Κατηγορία IV).
- Σε ασθενείς με μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη τύπου 2 συνιστάται μετά από ΑΕΕ η θεραπεία με πιογλιταζόνη (Κατηγορία III, Επίπεδο Β).
- Η θεραπεία με στατίνη συνιστάται σε ασθενείς με μη-καρδιοεμβολικά ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Συνιστάται η διακοπή του καπνίσματος (Κατηγορία III, Επίπεδο Γ).
- Συνιστάται η διακοπή της κατάχρησης αλκοολούχων ποτών (Κατηγορία IV).
- Συνιστάται η τακτική σωματική άσκηση (Κατηγορία IV).



- Συνιστάται δίαιτα πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και φυτικές ίνες και με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι και κορεσμένα λιπαρά (Κατηγορία IV, Επίπεδο G).
- Συνιστάται ελάττωση του σωματικού βάρους σε άτομα με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος (Κατηγορία IV, Επίπεδο G).
- Δε συνιστάται η χορήγηση αντιοξειδωτικών βιταμινούχων συμπληρωμάτων διατροφής (Κατηγορία I, Επίπεδο A). Οι βιταμίνες που ελαττώνουν τα επίπεδα ομοκυστεΐνης (φυλλικό, B12, B6) δε φαίνεται να ελαττώνουν τον κίνδυνο νέου ΑΕΕ, ενώ αντίθετα μπορεί και να αυξήσουν τον κίνδυνο αγγειακού συμβάματος (93).
- Δε συνιστάται η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης με οιστρογόνα στα πλαίσια της δευτερογενούς πρόληψης των ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται οι διαταραχές της αναπνοής κατά τη διάρκεια του ύπνου, όπως η αποφρακτική υπνική άπνοια, να αντιμετωπίζονται με μάσκα οξυγόνου θετικής πίεσης (CPAP) (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Η σύγκλιση ανοικτού ωοειδούς τμήματος μπορεί να αποτελέσει θεραπευτική επιλογή σε ασθενείς με κρυπτογενές ΑΕΕ (Κατηγορία IV).

#### Αντιθρομβωτική θεραπεία

- Συνιστάται η χορήγηση αντιθρομβωτικής αγωγής στους ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Ασθενείς που δε χρήζουν αντιπηκτικής θεραπείας συνιστάται να λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται η χορήγηση συνδυασμού ασπιρίνης-διπυριδαμόλης ή μόνο κλοπιδογρέλης, όπου αυτό είναι δυνατό. Εναλλακτικά μπορεί να χορηγηθεί μόνο ασπιρίνη ή μόνο τριφλουζάλη (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Δε συνιστάται ο συνδυασμός ασπιρίνης-κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με πρόσφατο ισχαιμικό ΑΕΕ, εκτός από περιπτώσεις με ειδικές ενδείξεις (π.χ. ασταθής στηθάγχη, non-Q έμφραγμα του μυοκαρδίου, πρόσφατη τοποθέτηση stent), στις οποίες η θεραπεία πρέπει να συνεχίζεται μέχρι και 9 μήνες μετά το επεισόδιο (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται η επανεκτίμηση της παθοφυσιολογίας και των παραγόντων κινδύνου στους ασθενείς που εγκαθιστούν ΑΕΕ παρά τη χορήγηση αντιαιμοπεταλιακής αγωγής (Κατηγορία IV).



- Η χορήγηση αντιπηκτικών από του στόματος (INR 2.0–3.0) συνιστάται σε ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ και κολπική μαρμαρυγή (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Συνιστάται η αποφυγή χορήγησης αντιπηκτικών από του στόματος σε ασθενείς με πτώσεις, πτωχή συμμόρφωση, ανεπαρκώς ρυθμιζόμενη επιληψία ή αιμορραγία από το πεπτικό (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Η προχωρημένη ηλικία και μόνο δεν αποτελεί αντένδειξη για την από του στόματος χορήγηση αντιπηκτικών (Κατηγορία I, Επίπεδο Α).
- Σε ασθενείς με καρδιοεμβολικό ΑΕΕ, που δε σχετίζεται με κολπική μαρμαρυγή και αυξημένο κίνδυνο υποτροπής συνιστάται η χορήγηση αντιπηκτικών (INR 2.0-3.0) (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Δε συνιστάται η χορήγηση αντιπηκτικών σε ασθενείς με μη καρδιοεμβολικό ΑΕΕ. Εξαιρούνται ειδικές περιπτώσεις, όπως η ύπαρξη αθηρωματικών αλλοιώσεων του αορτικού τόξου, ατρακτοειδών ανευρυσμάτων της βασικής αρτηρίας, διαχωρισμού της σπονδυλικής αρτηρίας ή συνύπαρξης ανοικτού ωοειδούς τρήματος με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση ή ανεύρυσμα του μεσοκολπικού διαφράγματος (Κατηγορία IV).
- Στις περιπτώσεις, που αντενδείκνυται η χορήγηση αντιπηκτικών, συνιστάται ο συνδυασμός ασπιρίνης και διπυριδαμόλης (Κατηγορία IV).

### Ασπιρίνη

Ανεξάρτητα της χορηγούμενης δόσης (50 έως 1300 mg ημερησίως) η ασπιρίνη μειώνει τις υποτροπές (94,95,96,97) αν και οι υψηλές δόσεις (>150mg ημερησίως) αυξάνουν τις επιπλοκές. Η χορήγηση ασπιρίνης σε ασθενείς με συμπτωματική στένωση ενδοκράνιας αρτηρίας είναι εξίσου αποτελεσματική και πιο ασφαλής από την χορήγηση αντιπηκτικών από του στόματος (98).

### Κλοπιδογρέλη

Η κλοπιδογρέλη είναι ελαφρώς πιο αποτελεσματική από την ασπιρίνη σε ότι αφορά στην πρόληψη αγγειακών συμβάντων (RR 0.91; 95% CI 0.84-0.97). Πιθανόν να είναι πιο αποτελεσματική σε ασθενείς υψηλού κινδύνου (π.χ. ασθενείς με ιστορικό παλαιού ΑΕΕ, περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια, συμπτωματική στεφανιαία νόσο ή σακχαρώδη διαβήτη) (99).



**Διπυριδαμόλη**

Η διπυριδαμόλη είναι εξίσου αποτελεσματική με την ασπιρίνη (100).

**Τριφλουζάλη**

Η τριφλουζάλη έχει παραπλήσια αποτελεσματικότητα με την ασπιρίνη και λιγότερες παρενέργειες (101).

**Διπυριδαμόλη και Ασπιρίνη**

Ο συνδυασμός ασπιρίνης (38-300 mg ημερησίως) και διπυριδαμόλης (200 mg βραδείας αποδέσμευσης, δις ημερησίως) μειώνει τον κίνδυνο αγγειακού θανάτου, ΑΕΕ ή εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με ασπιρίνη (RR 0.82, 95% CI 0.74-0.91) (100,102). Η λήψη διπυριδαμόλης μπορεί να προκαλέσει κεφαλαλγία, που όμως μπορεί να αποφευχθεί με τη βαθμιαία αύξηση της χορηγούμενης δόσης (103,104).

**Κλοπιδογρέλη και Ασπιρίνη**

Σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με κλοπιδογρέλη, ο συνδυασμός ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης δεν ελαττώνει τον κίνδυνο ισχαιμικού ΑΕΕ, εμφράγματος του μυοκαρδίου, αγγειακής αιτιολογίας θανάτου ή επανεισαγωγής στο νοσοκομείο (105). Ο συνδυασμός αυτός σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο μείζουσας αιμορραγίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης CHARISMA, ο συνδυασμός ασπιρίνης - κλοπιδογρέλης δε μειώνει τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου, ΑΕΕ, ή καρδιαγγειακής αιτιολογίας θανάτου σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με ασπιρίνη (99). Τέλος, ο συνδυασμός ασπιρίνης-κλοπιδογρέλης ελαττώνει τον κίνδυνο νέων αγγειακών συμβάντων σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο ή τοποθέτηση στεφανιαίου stent εντός του επομένου 12μηνου (106).

Η ενδεδειγμένη θεραπεία ασθενών που παρουσιάζουν νέα αγγειακά συμβάντα, ενώ βρίσκονται υπό αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, δεν έχει αποσαφηνιστεί. Στις περιπτώσεις αυτές επιβάλλεται η επανεκτίμηση της παθοφυσιολογίας του ΑΕΕ και η αυστηρή ρύθμιση των παραγόντων κινδύνου. Εναλλακτικά θα μπορούσε κανείς να μη μεταβάλλει τη χορηγούμενη αγωγή, να χορηγήσει ή να προσθέσει κι άλλη αντιαιμοπεταλιακή ουσία ή να ξεκινήσει τη χορήγηση αντιπηκτικών.



Χειρουργική και Αγγειοπλαστική

- Η καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή συνιστάται σε ασθενείς με στένωση 70–99% (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Ενδαρτηρεκτομές πρέπει να εκτελούνται μόνο σε κέντρα με ποσοστά περιεγχειρητικών επιπλοκών (ΑΕΕ κάθε τύπου και θάνατοι) κάτω του 6% (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Μετά την εγκατάσταση ΑΕΕ, συνιστάται η ταχύτερη δυνατή – ιδανικά εντός των πρώτων 2 εβδομάδων – διενέργεια καρωτιδικής ενδαρτηρεκτομής. (Κατηγορία II, Επίπεδο B).
- Η καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή μπορεί να έχει ένδειξη και σε συγκεκριμένες περιπτώσεις ασθενών με στένωση 50–69%. Άνδρες με ιστορικό πρόσφατης ημισφαιρικής σημειολογίας φαίνεται να ωφελούνται περισσότερο (Κατηγορία III, Επίπεδο G).
- Ενδαρτηρεκτομές σε περιπτώσεις καρωτιδικής στένωσης 50–69% πρέπει να εκτελούνται μόνο σε κέντρα με ποσοστά περιεγχειρητικών επιπλοκών (ΑΕΕ κάθε τύπου και θάνατοι) κάτω του 3% (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Δε συνιστάται η καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή σε ασθενείς με στένωση μικρότερη του 50% (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Συνιστάται η χορήγηση αντιαιμοπεταλιακής αγωγής πριν και μετά τη χειρουργική επέμβαση (Κατηγορία I, Επίπεδο A).
- Η ενδοαγγειακή αγγειοπλαστική της καρωτίδας με ή χωρίς τοποθέτηση stent συνιστάται σε επιλεγμένους ασθενείς (Κατηγορία I, Επίπεδο A). Η εφαρμογή θα πρέπει να περιορίζεται στις ακόλουθες υποομάδες ασθενών με σοβαρού βαθμού καρωτιδική στένωση: σε όσους αντενδείκνυται η διενέργεια ενδαρτηρεκτομής, σε όσους η στένωση δεν είναι χείρουργικά προσβάσιμη, σε όσους παρουσιάζουν επαναστένωση μετά από προηγούμενη καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή και σε περιπτώσεις μετακτινικής στένωσης (Κατηγορία IV). Οι ασθενείς θα πρέπει να λαμβάνουν αμέσως μετά την τοποθέτηση του stent και για διάστημα τουλάχιστον 1 μήνα συνδυασμό ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης (Κατηγορία IV).
- Σε ασθενείς με συμπτωματική ενδοκράνια στένωση πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν και η δυνατότητα ενδοαγγειακής αντιμετώπισης (Κατηγορία IV, GPC).
- Ο καθορισμός του βαθμού στένωσης θα πρέπει να γίνεται με βάση τα κριτήρια NASCET.



### 2.5.3. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΗ ΑΓΩΓΗ

Όπως προαναφέρθηκε, οι αυξημένες τιμές αρτηριακής πίεσης (> 120/80 mmHg) σχετίζονται ισχυρά και άμεσα με αυξημένη αγγειακή και γενική θνησιμότητα, χωρίς να αναφέρονται κάποιες συγκεκριμένες οριακές τιμές πίεσης (39). Η ελάττωση των τιμών αρτηριακής πίεσης, και πιο συγκεκριμένα ο βαθμός ελάττωσης των τιμών, μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο ΑΕΕ και στεφανιαίων συμβάντων (107,108,109). Η αρτηριακή πίεση πρέπει να επανέλθει σε επίπεδα κάτω των 140/85 (110), ενώ η αντιυπερτασική αγωγή πρέπει να είναι πιο επιθετική σε διαβητικούς ασθενείς (111). Ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων αντιυπερτασικών φαρμάκων είναι συχνά αναγκαίος, προκειμένου να επιτευχθούν οι προαναφερθέντες στόχοι.

Η μετα-ανάλυση επτά τυχαιοποιημένων μελετών έδειξε ότι η αντιυπερτασική αγωγή ελαττώνει τον κίνδυνο νέου ΑΕΕ σε ασθενείς που υπέστησαν ΑΕΕ ή ΠΠΕ (RR 0.76; 95% CI 0.63-0.92) (112). Στη μετα-ανάλυση αυτή συμπεριλήφθηκαν οι μελέτες PATS (ινδαπαμίδη), HOPE (ραμιπρίλη) και PROGRESS (περινδοπρίλη με ή χωρίς ινδαπαμίδη) (113,114,115,116). Η ελάττωση των ΑΕΕ παρατηρήθηκε ανεξάρτητα από τις τιμές της αρτηριακής πίεσης και του τύπου του ΑΕΕ. Επομένως, η αρτηριακή πίεση πρέπει να ελαττώνεται και να παρακολουθείται επ' αόριστον μετά από ΑΕΕ και ΠΠΕ.

Οι επιθυμητές τιμές αρτηριακής πίεσης και ο βαθμός ελάττωσης της δεν έχουν καθοριστεί με ακρίβεια. Θα πρέπει να εξατομικεύονται, αν και έχει διαπιστωθεί όφελος από τη μέση ελάττωση της αρτηριακής πίεσης κατά 10/5 mmHg και με φυσιολογικές τιμές ΑΠ <120/80 mmHg (117). Ακόμη και μικρή μείωση των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης, κατά 5-6 mmHg η συστολική και 2-3 mmHg η διαστολική ΑΠ, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ έως 40%. Η μείωση των ΑΕΕ αφορά στην εμφάνιση ισχαιμικών και αιμορραγικών ΑΕΕ (42,118). Να επισημάνουμε ότι η αρτηριακή πίεση δεν πρέπει να ελαττώνεται δραστικά σε ασθενείς με ΑΕΕ αιμοδυναμικής αιτιολογίας και σε ασθενείς με αμφοτερόπλευρη στένωση των καρωτίδων.

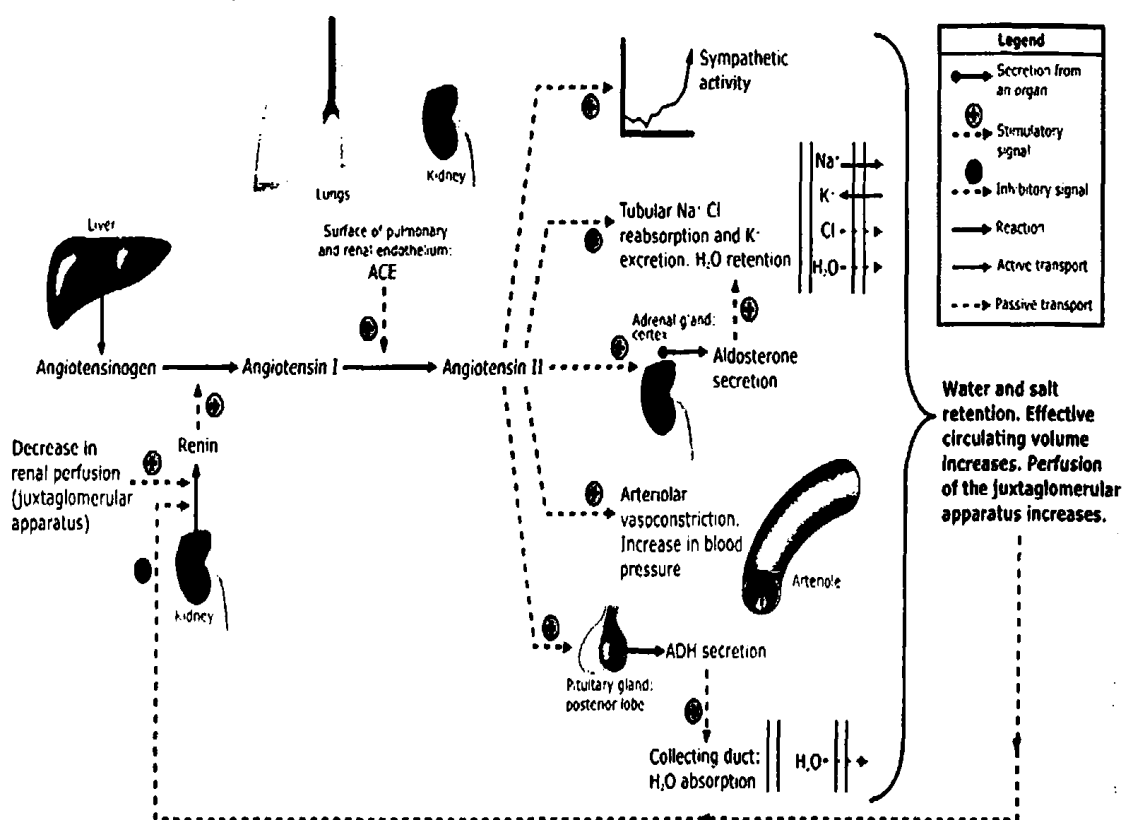




## 3. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΕΝΙΝΗΣ – ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ – ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

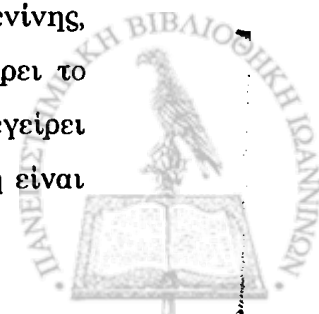
### 3.1. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

### Renin-angiotensin-aldosterone system



Εικόνα 3

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (Εικόνα 3) παρεμβαίνει στην ομοιόσταση του ανθρώπινου οργανισμού, συμμετέχοντας στη ρύθμιση του όγκου του εξωκυττάριου υγρού και στη ρύθμιση των περιφερικών αγγειακών αντιστάσεων και επηρεάζοντας, μέσω των μηχανισμών αυτών, την αρτηριακή πίεση και το κλάσμα εξώθησης. Όπως δηλώνεται από το όνομα του συστήματος, ασκεί τη ρυθμιστική του δράση μέσω τριών ουσιών, της ρενίνης, της αγγειοτενσίνης και της αλδοστερόνης. Συνοπτικά η ρενίνη διεγείρει το σχηματισμό της αγγιοτενσίνης στους ιστούς και αυτή με τη σειρά της διεγείρει την έκκριση αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια. Αναλυτικότερα η ρενίνη είναι



ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, που παράγεται και αποθηκεύεται στα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής του νεφρού. Όταν ελαττώνεται η νεφρική ροή αίματος στα ενδονεφρικά αρτηριόλια, όταν υπάρξει διέγερση του συμπαθητικού ή όταν μειωθεί το ποσό του Na στα κύτταρα της πυκνής κηλίδας στα άπω εσπειραμένα σωληνάκια, τα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής (στα τοιχώματα των προσαγωγών αρτηριδίων αμέσως πριν από τα σπειράματα) εκκρίνουν ρενίνη (Πίνακας 3). Η ρενίνη παραμένει στο αίμα για 30 λεπτά έως μία ώρα και στο διάστημα αυτό υδρολύει το αγγειοτενσινογόνο, μια σφαιρίνη που παράγεται στο ήπαρ, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός ανενεργού δεκαπεπτιδίου, της αγγειοτενσίνης I. Η αγγειοτενσίνη I, μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα από το σχηματισμό της, υδρολύεται από το μετατρεπτικό ένζυμο (ACE) με αποτέλεσμα την απόσπαση δύο ακόμη αμινοξέων και την παραγωγή ενός ενεργού οκταπεπτιδίου, της αγγειοτενσίνης II.

- Υπόταση στη νεφρική αρτηρία (είτε λόγω συστηματικής υπότασης, είτε λόγω συστηματικής υποογκαιμίας, είτε λόγω στένωσης της νεφρικής αρτηρίας)
- Διέγερση συμπαθητικού νευρικού συστήματος (μέσω των βι αδρενεργικών υποδοχέων)
- Υπονατρίαμια (μειωμένο Na στα άπω εσπειραμένα σωληνάκια του νεφρού)

### Πίνακας 3: Αίτια έκκρισης ρενίνης

Το μετατρεπτικό ένζυμο (διπεπτυλκαρβοξυπεπτιδάση ή κινάση II) είναι ευρέως κατανομημένο στο σώμα, είτε ως μόριο συνδεδεμένο στην κυτταρική μεμβράνη – ενδοθηλιακά κύτταρα, νεφροί, έντερο, εγκέφαλος – είτε ως ευδιάλυτο ένζυμο στο πλάσμα και σε μικρότερες ποσότητες στο αμνιακό υγρό και στο σπέρμα. Η μετατροπή της αγγειοτενσίνης I σε αγγειοτενσίνη II γίνεται σχεδόν αποκλειστικά στους πνεύμονες αλλά και σε άλλους ιστούς, όπως είναι το ενδοθήλιο των αγγείων, η μεσαγγειακή ουσία των σπειραμάτων των νεφρών, η καρδιά και ο εγκέφαλος.

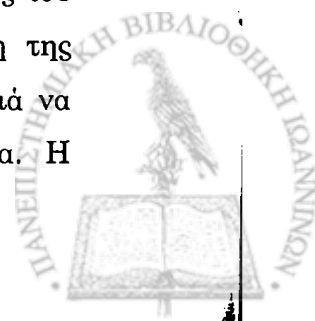
Η αγγειοτενσίνη II είναι η πιο ισχυρή αγγειοσυσπαστική ουσία στον ανθρώπινο οργανισμό και παραμένει στο αίμα μόνο για διάστημα ενός περίπου λεπτού από την παραγωγή της, γιατί αδρανοποιείται γρήγορα από διάφορα



ένζυμα του αίματος και των ιστών, που έχουν το γενικό όνομα αγγειοτενσινάσες. Οι υποδοχείς της αγγειοτενσίνης είναι υποδοχείς, που συνδέονται μέσω G-protein με την αγγειοτενσίνη ως κύριο συνδέτη. Μέσω των υποδοχέων αυτών μεταφέρεται το μήνυμα για τη δράση της ορμόνης. Υπάρχουν δύο είδη υποδοχέων, οι υποδοχείς AT1 και AT2, οι οποίοι μοιάζουν στη δομή τους κατά 30% περίπου και έχουν ως κύριο μόριο σύνδεσης την αγγειοτενσίνη II. Έχουν αναγνωριστεί και άλλα δύο είδη υποδοχέων, οι AT3 και AT4. Οι AT4 ενεργοποιούνται από το μεταβολίτη αγγειοτενσίνη IV της αγγειοτενσίνης II και μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της αγγειοτενσίνης στο μεσοκυττάριο χώρο του ΚΝΣ.

Οι AT1 υποδοχείς είναι οι καλύτερα μελετημένοι υποδοχείς. Είναι συνδεδεμένοι με τη φωσφολιπάση C και η σύνδεσή τους με την αγγειοτενσίνη II αυξάνει το ενδοπλασματικό (cytosolic)  $Ca^{2+}$ . Επίσης αναστέλουν την αδενυλική κυκλάση και ενεργοποιούν πολλές κινάσες της τυροσίνης. Δράσεις που ελέγχονται μέσω των υποδοχέων AT1 περιλαμβάνουν (Εικόνα 4) την αγγειοσύσπαση, τη σύνθεση και έκκριση αλδοστερόνης, την αύξηση της έκκρισης βαζοπρεσσίνης, την υπερτροφία του μυοκαρδίου, την αυξημένη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου, την αύξηση της περιφερικής νοραδρεναργικής δραστηριότητας, τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων του τοιχώματος των αγγείων, τη μείωση της νεφρικής ροής αίματος, την αύξηση της νεφρικής επαναπρόσληψης Na, την τροποποίηση της δραστηριότητας του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και την κεντρική ρύθμιση της ωσμωτικότητας. Οι υποδοχείς AT2 είναι αριθμητικά άφθονοι στα έμβρυα και στα νεογένητα. Μέσω της δράσης τους προκαλείται ανάπτυξη των ιστών των εμβρύων, ρύθμιση του εξωκυττάριου χώρου, νευρωνική αναγέννηση, κυτταρική διαφοροποίηση, απόπτωση και ίσως και αγγειοδιαστολή.

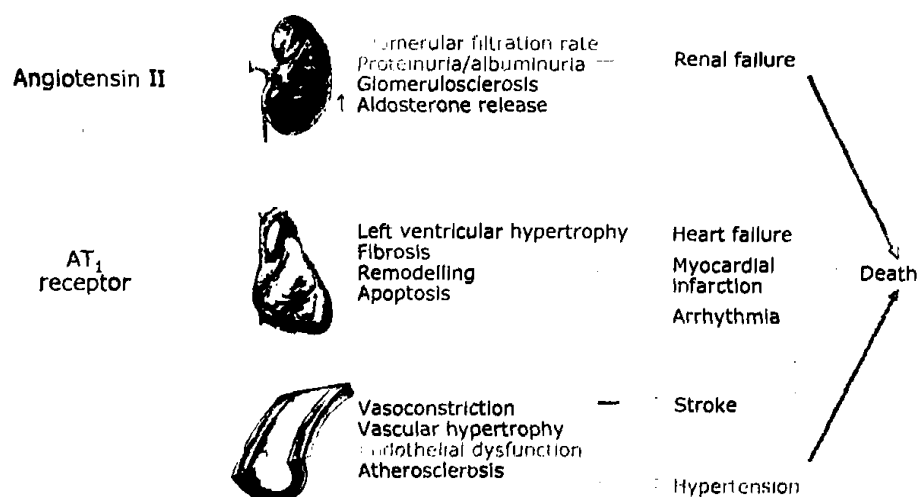
Η αγγειοτενσίνη II επιδρά με διάφορους μηχανισμούς, κυρίως μέσω των AT1 υποδοχέων (Εικόνα 4,5), προκαλώντας κατά κύριο λόγο αύξηση της πίεσης. Μία από τις επιδράσεις αυτές, ιδιαίτερα άμεση, είναι η αγγειοσύσπαση ιδιαίτερα των αρτηριδίων και λιγότερο των φλεβών. Η σύσπαση των αρτηριδίων αυξάνει τις περιφερικές αντιστάσεις και προκαλεί αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Η ελαφρά σύσπαση των φλεβών αυξάνει τη μέση πίεση πλήρωσης του κυκλοφορικού, μερικές φορές μέχρι 20%, με αποτέλεσμα την αύξηση της επανόδου του φλεβικού αίματος στην καρδιά βοηθώντας έτσι την καρδιά να υπερνικήσει τον επιπλέον φόρτο πίεσης και να προωθήσει το αίμα. Η



αγγειοσυσπαστική δράση της αγγειοτενσίνης II αφορά σε όλη την έκταση του ανθρώπινου σώματος και συνεπάγεται αύξηση των ολικών περιφερικών αντιστάσεων. Η αύξηση αυτή των αντιστάσεων έχει σημασία όχι μόνο για το βραχυπρόθεσμο αλλά και για το μακροπρόθεσμο έλεγχο της πίεσης. Οι άλλες επιδράσεις της αγγειοτενσίνης έχουν σχέση κυρίως με τον όγκο των υγρών του σώματος. Έτσι η αγγειοτενσίνη επιδρά άμεσα στους νεφρούς προκαλώντας αύξηση της αντίστασης των νεφρικών αρτηριδίων, που συνεπάγεται ελάττωση της νεφρικής αιματικής ροής και άρα και της πίεσης στα περιωληναριακά τριχοειδή, με αποτέλεσμα αύξηση του ρυθμού της επαναρρόφησης νερού και ηλεκτρολυτών από τα νεφρικά σωληνάκια. Ακόμη διεγείρει την έκκριση αλδοστερόνης από το φλοιό των επινεφριδίων, που με τη σειρά της προκαλεί ελάττωση της έκκρισης Na και νερού από τους νεφρούς και διεγείρει την υπόφυση προς παραγωγή αντιδιουρητικής ορμόνης, η οποία με τη σειρά της δρα στον άπω νεφρώνα για κατακράτηση νερού. Οι σημαντικότερες δράσεις της αγγειοτενσίνης II συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

## Angiotensin II

### Direct and indirect effects in organ damage



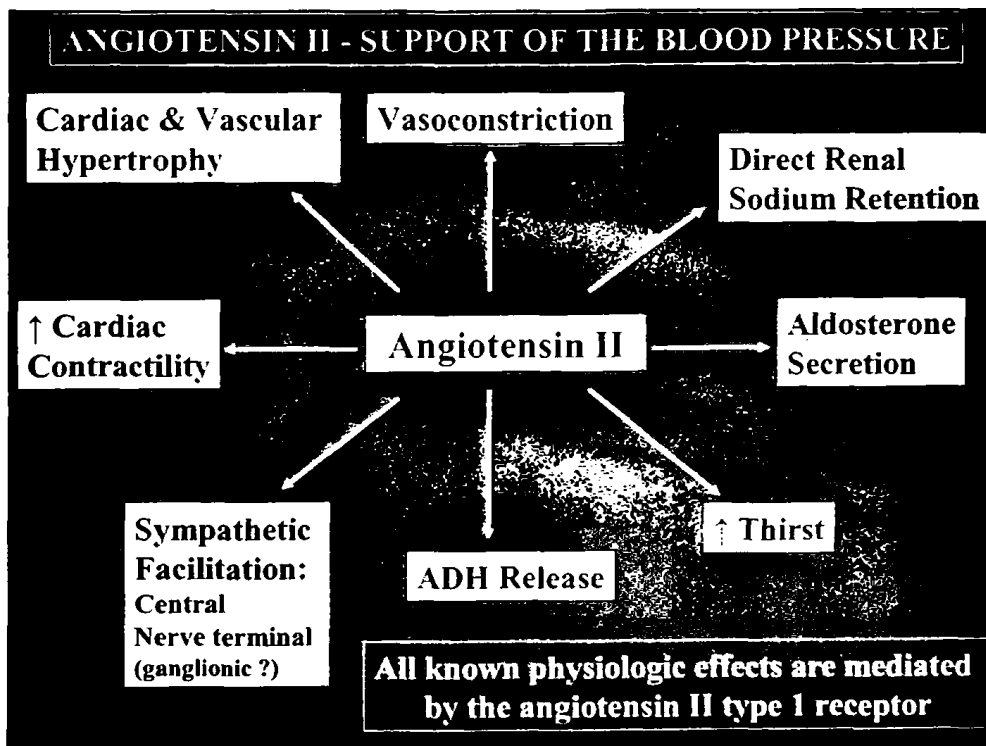
*Am J Hypertens 1999 Dec;12(12 Pt 1-2):160S-166S*

**Εικόνα 4:** Η αγγειοτενσίνη II δρα μέσω των AT<sub>1</sub> υποδοχέων



- Σημαντική σύσπαση των περιφερικών αρτηριδίων.
- Μέτρια σύσπαση των φλεβών.
- Ευόδωση της απελευθέρωσης νορεπινεφρίνης από τα νεύρα του συμπαθητικού συστήματος και αναστολή της επαναπρόσληψής της.
- Μέσω της επινεφρίνης, συμπαθητική δράση στην καρδιά και στα αγγεία.
- Σύσπαση των νεφρικών αρτηριδίων και μείωση της νεφρικής ροής αίματος.
- Διέγερση της έκκριση αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια, η οποία επαναροφά νάτριο και νερό στον άπω νεφρώνα και εκκρίνει κάλιο σε ανταλλαγή του νατρίου, που επαναροφά.
- Μέσω της αλδοστερόνης δράση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα με αύξηση της όρεξης για πρόσληψη αλατιού και αίσθημα δίψας, που οδηγεί σε αυξημένη πρόσληψη νερού.
- Έκκριση αντιδιουρητικής ορμόνης από την υπόφυση.

*Πίνακας 4: Οι σημαντικότερες δράσεις της αγγειοτενσίνης II*



*Εικόνα 5: Δράση της αγγειοτενσίνης II στα συστήματα*



**Συμπέρασμα:** Η ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης οδηγεί σε αύξηση του ενδοαγγειακού όγκου και της αρτηριακής πίεσης.

Αντιθέτως η άνοδος της αρτηριακής πίεσης προκαλεί ελάττωση της έκκρισης ρενίνης από τους νεφρούς, ελάττωση της έκκρισης αγγειοτενσίνης από τους ιστούς και αλδοστερόνης από το φλοιό των επινεφριδίων και ελάττωση των ώσεων του συμπαθητικού προς τους νεφρούς.

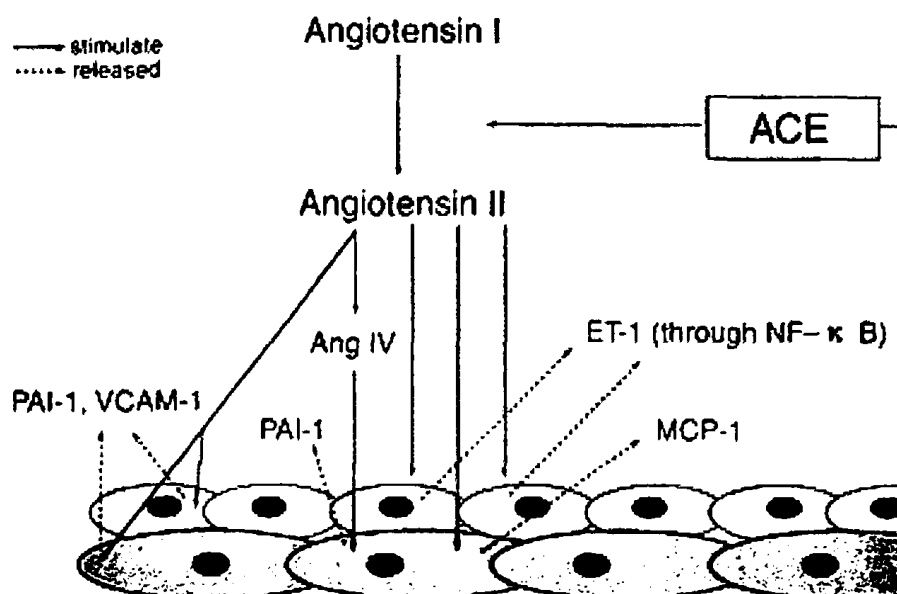
Η αγγειοτενσίνη II, εκτός της αγγειοσυσπαστικής της δράσης και των λοιπών μηχανισμών προς αύξηση του ενδοαγγειακού όγκου και της αρτηριακής πίεσης, έχει ποικίλες δράσεις στο ενδοθήλιο, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 και στην Εικόνα 6.

#### Η αγγειοτενσίνη II στο ενδοθήλιο:

- Προκαλεί άμεση υπερτροφία των λείων μυικών κυττάρων των αγγείων.
- Προκαλεί υπερτροφία των λείων μυικών κυττάρων των αγγείων μέσω της διέγερσης της έκκρισης του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (FGF).
- Προκαλεί την απελευθέρωση του προερχόμενου από τα αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα (PDGF), προκαλώντας πάχυνση του αγγειακού τοιχώματος.
- Απελευθερώνει από το ενδοθήλιο την ενδοθηλίνη, η οποία είναι από τους ισχυρότερους αγγειοσυσπαστικούς παράγοντες και που, εκτός της αγγειοσυσπαστικής της δράσης, διεγείρει επιπλέον την πάχυνση του ενδοθηλίου.
- Προκαλεί την έκφραση του μορίου συγκόλλησης V-CAM-1 των αγγειακών κυττάρων, το οποίο επιστρατεύει φλεγμονώδη κύτταρα στην περιοχή.
- Διευκολύνει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο και το σχηματισμό θρόμβου, εφόσον η AII μετακινεί τη φυσιολογική ισορροπία μεταξύ των ουσιών της αιμόστασης προς τη θρόμβωση.
- Αναστέλλει τον EDHF, έναν αγγειοδιασταλτικό παράγοντα, ο οποίος προκαλεί έξοδο καλίου επιφέροντας υπερπόλωση του λείου αγγειακού μυός και αγγειοδιαστολή.
- Διεγείρει τον καταβολισμό της ουσίας P, η οποία είναι υπεύθυνη για τη διέγερση της απελευθέρωσης NO.
- Διεγείρει το σχηματισμό ενός υπεροξειδωτικού ανιόντος με τη μεσολάβηση του ενζύμου νικοτιναμιδική αδενλική δινουκλεοσιδική φωσφορική οξειδάση (NADPH). Το υπεροξείδιο αυτό αδρανοποιεί με τη σειρά του το νιτρικό οξείδιο (NO).

**Πίνακας 5:** Δράσεις της αγγειοτενσίνης II στο ενδοθήλιο



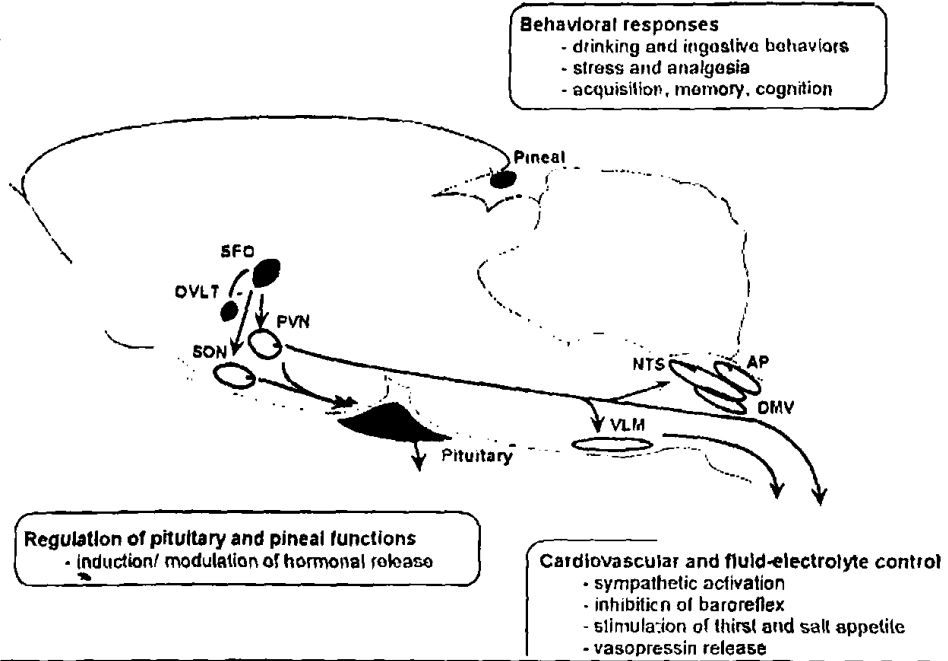


*Εικόνα 6: Δράσεις της αγγειοτενσίνης II στο ενδοθήλιο*

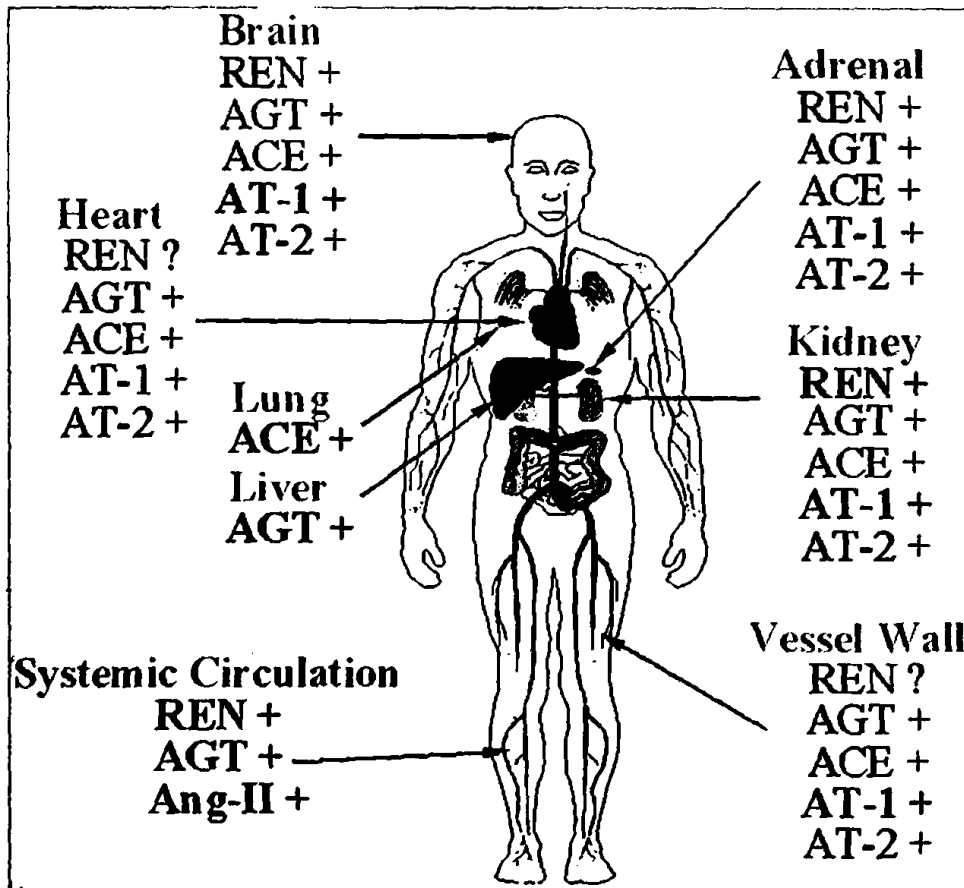
**Συμπέρασμα:** Η αγγειοτενσίνη επηρεάζει ποικιλοτρόπως το ενδοθήλιο προκαλώντας αγγειοσύσπαση και ευοδώνοντας τη διαδικασία της αθηρωμάτωσης.

Εκτός της δράσης του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης στο αγγειακό σύστημα, στην καρδιά και στο ενδοθήλιο, φαίνεται ότι η ρενίνη και η αγγειοτενσίνη παράγονται και δρουν και σε άλλους ιστούς. Ήδη αναφέραμε τη δράση μέσω των υποδοχέων AT2 στη διαφοροποίηση των κυττάρων και την ανάπτυξη των εμβρύων. Στον εγκέφαλο (119), εκτός της δράσης που σχετίζεται με το αίσθημα δίψας και την ενεργοποίηση του συμπαθητικού, οι αγγειοτενσίνες επιδρούν στη διαδικασία της κατανόησης, στη μνήμη, στον πόνο κ.α. (Εικόνα 7). Φαίνεται λοιπόν ότι το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης είναι ένα σύνθετο σύστημα με πολλαπλούς μηχανισμούς και τρόπους δράσεις σε πολλά και διαφορετικά συστήματα (Εικόνα 8) στις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης.





*Εικόνα 7: Η δράση των αγγειοτενινογών στο ΚΝΣ*



*Εικόνα 8: Δράση του RAS σε διάφορα όργανα*



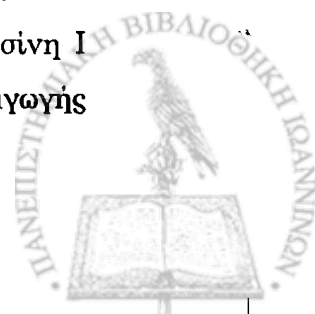


### **3.2. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ**

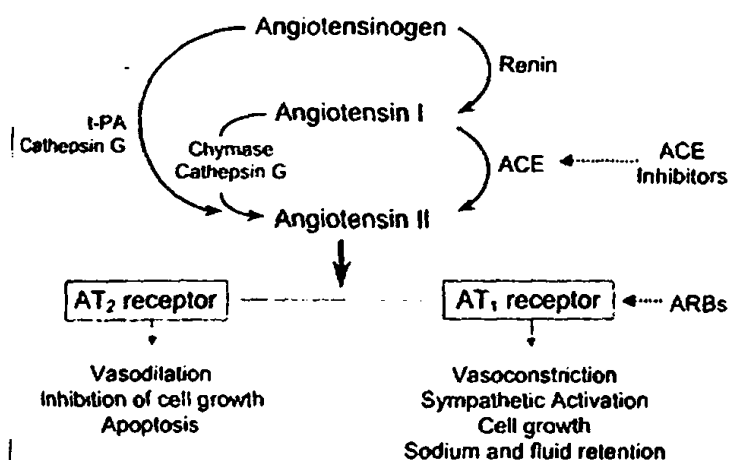
Ως υπέρταση ορίζεται η αυξημένη συστολική αρτηριακή πίεση  $\geq 140$  mm Hg, η οποία μπορεί να συνοδεύεται και από αύξηση των τιμών της διαστολικής αρτηριακής πίεσης  $\geq 90$  mm Hg στους ενήλικες. Οι τιμές αυτές θα πρέπει να είναι ο μέσος όρος δύο τουλάχιστον μετρήσεων σε δύο διαφορετικές επισκέψεις του ασθενή. Μία και μόνο μέτρηση της συστολικής πίεσης με τιμή  $\geq 210$  mm Hg ή της διαστολικής πίεσης με τιμή  $\geq 120$  mm Hg, ιδιαίτερα αν συνυπάρχουν συμπτώματα, είναι αρκετή για να τεθεί η διάγνωση της υπέρτασης. Η νόσος έχει συχνότητα περίπου 20% στους ενήλικες, είναι συνήθως ασυμπτωματική και αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα με δύο κυρίως επιδράσεις: α) την αύξηση του καρδιακού όγκου β) την πρόκληση βλαβών στα τοιχώματα των αρτηριών.

Ο στόχος του ελέγχου της αρτηριακής πίεσης είναι η μείωση της νοσηρότητας και της θνητότητας, που σχετίζονται με την υπέρταση, εφόσον, ως παράδειγμα, μια μικρή μείωση των τιμών της πίεσης κατά μέσο όρο 9/5 mm Hg, μειώνει κατά 35-35% τον κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ σε 2-3 χρόνια από την έναρξη της αντιυπερτασικής αγωγής (107,108,109). Η αντιμετώπιση της υπέρτασης μπορεί να γίνει με μη φαρμακευτικά και φαρμακευτικά μέτρα. Τα μη φαρμακευτικά μέτρα περιλαμβάνουν την απώλεια βάρους, τη μείωση της πρόσληψης άλατος, τη διακοπή του καπνίσματος, την αύξηση της αερόβιας άσκησης, τη μείωση της πρόσληψης αλκοόλ και την υιοθέτηση ενός διαιτολογίου με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και πλούσιο σε φρούτα και λαχανικά. Τα φαρμακευτικά μέτρα συνιστούν τη χορήγηση κάποιου φαρμάκου ή συνδυασμού αντιυπερτασικών φαρμάκων, ανάλογα με τις τιμές της αρτηριακής πίεσης και τις πιέσεις στόχους, οι οποίες στο γενικό πληθυσμό είναι τιμές  $<140/90$  mm Hg ενώ σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι  $<130/80$  mm Hg.

Οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου ( $\alpha$ -ΜΕΑ) χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία της υπέρτασης, της καρδιακής ανεπάρκειας, της δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας, του εμφράγματος του μυοκαρδίου και της πρωτεϊνικής νεφροπάθειας. Οι  $\alpha$ -ΜΕΑ συνδέονται με το μετατρεπτικό ένζυμο και αναστέλλουν την αντίδραση του ενζύμου με την αγγειοτενσίνη I προς σχηματισμό αγγειοτενσίνης II, με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής της αγγειοτενσίνης II (Εικόνα 9).



## Renin-Angiotensin Cascade



**Εικόνα 9:** Οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου (ACE) μειώνουν την παραγωγή αγγειοτενσίνης II

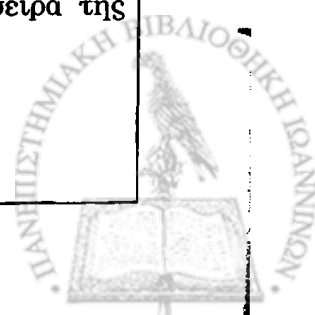
Σε σχέση με τη δράση των α-MEA στο ενδοθήλιο, η μειωμένη παραγωγή της αγγειοτενσίνης II αυξάνει τη συγκέντρωση της ουσίας P και ακολούθως την παραγωγή του NO. Ο μη σχηματισμός του υπεροξειδωτικού ανιόντος από το NADPH, που μπλοκάρεται επίσης από τους α-MEA, προάγει τη δράση του NO. Επιπρόσθετα, ως γνωστόν, το μετατρεπτικό ένζυμο, εκτός της σύνδεσής του με την αγγειοτενσίνη I, καταλύει τον καταβολισμό της βραδυκινίνης. Συνεπώς οι α-MEA, μέσω της αναστολής του μετατρεπτικού ενζύμου, αυξάνουν τη συγκέντρωση της βραδυκινίνης στο περιφερικό αίμα.

Αυξημένη ρενίνη πλάσματος δεν απαιτείται για τη δράση των α-MEA, αν και είναι περισσότερο αποτελεσματικοί, ως προς τη ρύθμιση της υπέρτασης, όταν τα κυκλοφορούντα στο πλάσμα επίπεδα ρενίνης είναι αυξημένα. Γνωρίζοντας ότι το σύστημα βρίσκεται και δρα σε πολλούς ιστούς και όργανα, όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος, τα αγγεία και οι νεφροί, οι α-MEA μπορούν και δρουν απευθείας στους ιστούς αυτούς, εκτός από τη δράση τους στο μπλοκάρισμα της μετατροπής της κυκλοφορούσας αγγειοτενσίνης I στο πλάσμα,



η οποία είναι αυξημένη όταν και τα επίπεδα ρενίνης είναι αυξημένα. Η δράση των α-MEA φαίνεται στον πίνακα 6.

- Αναστολή της παραγωγής της αγγειοτενσίνης II, προκαλώντας διαστολή των αγγείων.
- Αύξηση της απέκκρισης νερού και Na από τους νεφρούς, μπλοκάροντας τη δράση της αγγειοτενσίνης II στους νεφρούς και μειώνοντας την παραγωγή της αλδοστερόνης (διουρητική και νατριουρητική δράση).
- Μείωση της ιδιοπαθούς αρτηριακής πίεσης
- Μείωση της αρτηριακής πίεσης, της οφειλόμενης σε στένωση της νεφρικής αρτηρίας, η οποία είναι ρετινοεξαρτώμενη λόγω της αυξημένης παραγωγής ρενίνης που η στένωση της νεφρικής αρτηρίας προκαλεί.
- Μείωση της συμπαθητικής αδρενεργικής δράσης στην καρδιά και στα αγγεία, μέσω μειωμένης παραγωγής νορεπινεφρίνης και αυξημένης επαναπρόσληψής της.
- Μείωση του όγκου αίματος στις φλέβες και στις αρτηρίες και μείωση του προφορτίου και του μεταφορτίου της καρδιάς.
- Βελτίωση του κλάσματος εξώθησής της καρδιάς και της συστολικής λειτουργίας της.
- Μέσω της μείωσης του προφορτίου, μείωση της πνευμονικής και συστηματικής συμφόρησης και μείωση της πιθανότητας ανάπτυξης πνευμονικού οιδήματος.
- Μέσω της μείωσης του προφορτίου και του μεταφορτίου, μείωση των απαιτήσεων των ιστών σε οξυγόνο.
- Αύξηση της παραγωγή του NO, το οποίο επιτελεί τις ακόλουθες ζωτικές λειτουργίες στην πρόληψη των καρδιοαγγειακών παθήσεων:
  - αναστολή παραγωγής ενδοθηλίνης, προλαμβάνοντας την αγγειοσύσπαση
  - αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων
  - αποκλεισμό συγκολλησής των ουδετεροφίλων στο ενδοθήλιο
- Αναστολή της αποδόμησης της βραδυκινίνης η οποία με τη σειρά της προκαλεί:
  - διέγερση της συνθετάσης του NO
  - άσκηση άμεσης αγγειοδιασταλτικής δράσης



- πρόληψη του πολλαπλασιασμού των λείων μυικών κυττάρων
- πρόληψη της συγκόλλησης των μακροφάγων στο τοίχωμα των αγγείων
- διέγερση της έκκρισης του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου (t-PA), ενός ισχυρού αντιθρομβωτικού παράγοντα
- ενεργοποίηση προσταγλανδινών

***Πίνακας 6: Δράσεις των αναστολέων μετατρεπτικού ενζύμου***

Στα ευρήματα επιδημιολογικών και ερευνητικών μελετών, που παρουσίαζαν την ενεργοποίηση του συστήματος RAS να ευθύνεται για αυξημένο κίνδυνο καρδιοαγγειακών συμβάντων (120,121,122), στηρίχτηκε ο σχεδιασμός της μελέτης HOPE (114). Στην πολυκεντρική διπλή τυφλή μελέτη εντάχθηκαν 9297 ασθενείς με αρτηριακή αθηροσκληρωτική νόσο (ιστορικό εμφράγματος, εγκεφαλικού επεισοδίου ή περιφερική αρτηριακή νόσο) ή με σακχαρώδη διαβήτη σε συνδυασμό με ένα ακόμη παράγοντα κινδύνου, ηλικίας 55 ετών και άνω, οι οποίοι έλαβαν ραμιπρίλη ή εικονικό φάρμακο και τέθηκαν σε παρακολούθηση για μια μέση περίοδο 5 ετών. Πρωτεύων στόχος της μελέτης ήταν να συγκριθούν οι δύο ομάδες ως προς την εμφάνιση εμφράγματος, ΑΕΕ και ως προς την πρόκληση θανατηφόρων αγγειακών συμβάντων. Τα χαρακτηριστικά των δύο ομάδων, των ομάδων της ραμιπρίλης και της ομάδας ελέγχου φαίνονται στον Πίνακα 7.

Στην ομάδα της ραμιπρίλης μειώθηκαν τα εγκεφαλικά επεισόδια, τα εμφράγματα και η θνητότητα από καρδιοαγγειακά αίτια σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, εφόσον 156 ασθενείς στην ομάδα της ραμιπρίλης έναντι 226 ασθενών στην ομάδα ελέγχου υπέστησαν ΑΕΕ, 459 ασθενείς στην ομάδα της ραμιπρίλης έναντι 570 ασθενών στην ομάδα ελέγχου υπέστησαν έμφραγμα και 282 ασθενείς στην ομάδα της ραμιπρίλης έναντι 377 ασθενών στην ομάδα ελέγχου κατέληξαν από καρδιοαγγειακά αίτια. Η μείωση των εμφραγμάτων, ΑΕΕ και θανάτων στην ομάδα της ραμιπρίλης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου φαίνεται στην καμπύλη Kaplan στο Γράφημα 5.



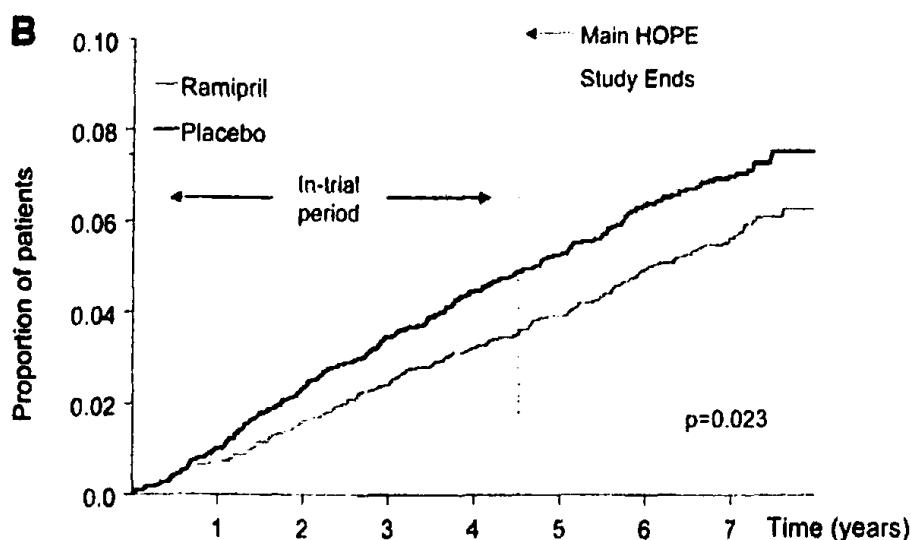
CHARACTERISTIC	RAMIPRIL GROUP (N=4645)	PLACEBO GROUP (N=4652)
Age — yr	66±7	66±7
Blood pressure — mm Hg	139±20/79±11	139±20/79±11
Heart rate — beats/min	69±11	69±11
Body-mass index	28±4	28±4
Female sex — no. (%)	1279 (27.5)	1201 (25.8)
History of coronary artery disease — no. (%)	3691 (79.5)	3786 (81.4)
Myocardial infarction	2410 (51.9)	2482 (53.4)
Within ≤1 year	452 (9.7)	446 (9.6)
Within >1 year	1958 (42.2)	2036 (43.8)
Stable angina pectoris	2544 (54.8)	2618 (56.3)
Unstable angina pectoris	1179 (25.4)	1188 (25.5)
CABG	1192 (25.7)	1207 (25.9)
PTCA	853 (18.4)	806 (17.3)

*Πίνακας 7: Τα χαρακτηριστικά των ομάδων της ραμιπρίλης και της ομάδας ελέγχου (N Engl J Med 2000;342:145-153)*

Η μείωση των επεισοδίων δε δικαιολογείται από τη μείωση της αρτηριακής πίεσης και μόνο, εφόσον κατά την ένταξη στη μελέτη οι περισσότεροι ασθενείς ήταν νορμοτασικοί και η πτώση της ΑΠ στην ομάδα που λάμβανε τη ραμιπρίλη ήταν εξαιρετικά μικρή (3/2 mmHg). Βέβαια μελέτες υποστηρίζουν ότι ακόμη και μια μικρή περαιτέρω μείωση της ΑΠ σε άτομα με αθηρωματική νόσο και καλή ρύθμιση της ΑΠ μπορεί να μειώσει ακόμη περισσότερο τα καρδιοαγγειακά συμβάντα (123), όμως στην παρούσα μελέτη η μικρή μείωση της ΑΠ υπολογίζεται να έχει συμβάλει στη μείωση των επεισοδίων αλλά να μην είναι καθοριστική. Περισσότερο καθοριστική φαίνεται να είναι η άμεση δράση της ραμιπρίλης στο ενδοθήλιο με τη μείωση της αγγειοσπαστικής δράσης της αγγειοτενσίνης II, την αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυικών κυττάρων και της ρήξης της πλάκας, και την ευόδωση της ινωδόλυσης (124,125).

Σε σχέση με τους δευτερεύοντες στόχους της μελέτης, λιγότεροι ασθενείς στην ομάδα της ραμιπρίλης παρουσίασαν καρδιακή ανακοπή, καρδιακή ανεπάρκεια, επιπλοκές από σακχαρώδη διαβήτη ή νεοδιαγνωσθέντα σακχαρώδη διαβήτη στα 5 χρόνια της παρακολούθησης.





**Γράφημα 5:** Μείωση των επεισοδίων στην ομάδα της ραμιπρίλης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Τα αποτελέσματα που αφορούσαν στα ΑΕΕ ανακοινώθηκαν ειδικά σε μία ακόμη μελέτη (126). Ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης οποιουδήποτε ΑΕΕ μειώθηκε κατά 32% (156 έναντι 226), ενώ ο σχετικός κίνδυνος μείωσης θανατηφόρων ΑΕΕ μειώθηκε κατά 61% (17 έναντι 44). Η μείωση των ΑΕΕ στην ομάδα της ραμιπρίλης αφορούσε στο σύνολο των επεισοδίων, στα ισχαιμικά και στα αιμορραγικά ΑΕΕ, στα θανατηφόρα ΑΕΕ, στα ΑΕΕ με σοβαρό έλλειμμα και στα λιγότερο σοβαρά ΑΕΕ όπως φαίνεται στον Πίνακα 8. Λόγω των εντυπωσιακών αποτελεσμάτων της μελέτης, άλλοι 2317 ασθενείς προστέθηκαν στη μελέτη και τέθηκαν σε άλλα 4 χρόνια παρακολούθησης; μαζί με τους ασθενείς που είχαν ήδη ενταχθεί στη HOPE. Η νέα αυτή μελέτη (115) αποσκοπούσε στην εκτίμηση της επίδρασης της ραμιπρίλης στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών συμβάντων και σακχρώδη διαβήτη στην ομάδα της ραμιπρίλης και στην ομάδα των controls (Εικόνα 10).



Outcome	Ramipril (n=4645)	Placebo (n=4652)	Relative risk (95% CI)
Total strokes	156 (3.4)	226 (4.9)	0.68 (0.56 to 0.84)
Non-fatal:	139 (3.0)	182 (3.9)	0.76 (0.61 to 0.94)
No functional impairment	49 (1.1)	80 (1.7)	0.61 (0.43 to 0.87)
Some functional impairment*	85 (1.8)	108 (2.3)	0.78 (0.59 to 1.04)
Fatal	17 (0.4)	44 (1.0)	0.39 (0.22 to 0.67)
<b>Subtype of stroke</b>			
Ischaemic	101 (2.2)	157 (3.4)	0.64 (0.50 to 0.82)
Non-ischaemic†:	63 (1.4)	78 (1.7)	0.80 (0.57 to 1.12)
Haemorrhagic	12 (0.26)	16 (0.34)	0.74 (0.35 to 1.57)
Uncertain aetiology	52 (1.1)	65 (1.4)	0.79 (0.55 to 1.14)

*Πίνακας 8: Τα είδη των ΑΕΕ στις ομάδες ραμιπρίλης και control.*

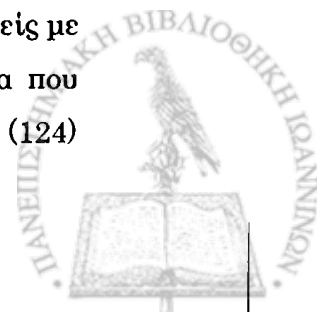
## Long-Term Effects of Ramipril on Cardiovascular Events and on Diabetes

Results of the HOPE Study Extension

HOPE/HOPE-TOO Study Investigators\*

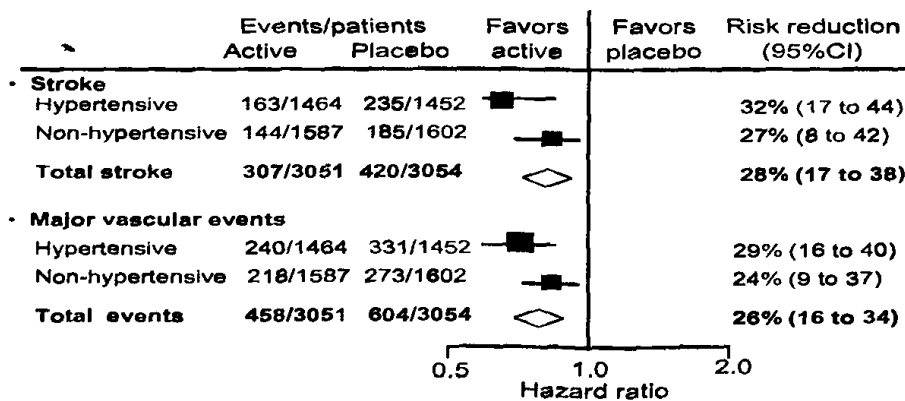
*Εικόνα 10: Αποτελέσματα της ραμιπρίλης στα καρδιαγγειακά συμβάντα και στο σακχαρώδη διαβήτη.*

Στη μελέτη PROGRESS (116) 6105 ασθενείς με ιστορικό ΑΕΕ ή παροδικού ισχαιμικού επεισοδίου, με ή χωρίς υπέρταση, τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν περιδνοπρίλη (με ή χωρίς ινδαπαμίδη) ή εικονικό φάρμακο για μια μέση περίοδο 4 ετών. Στην ομάδα της περιδνοπρίλης υπήρξε στατιστικά μεγαλύτερη μείωση στην επανεμφάνιση ΑΕΕ ή ΠΠΕ (Πίνακας 9). Το αποτέλεσμα ήταν επιπρόσθετο της αντιυπερτασικής δράσης, αποδεικνύοντας ότι η προστατευτική δράση του α-MEA ήταν ανεξάρτητη από τη δράση του φαρμάκου στην υπέρταση και αφορούσε στις ευνοϊκές επιδράσεις του φαρμάκου απευθείας στο ενδοθήλιο των αγγείων. Τόσο η μελέτη HOPE όσο και η μελέτη PROGRESS αναδεικνύουν την αποτελεσματικότητα των α-MEA σε ασθενείς με αθηρωματική νόσο, υπερτασικούς ή νορματασικούς, αποτελεσματικότητα που υποστηρίζεται και από άλλες μελέτες (127). Στη μελέτη SECURE (124)



εκτιμήθηκε, σε σύνολο 732 ασθενών με αθηρωματική νόσο ή σακχαρώδη διαβήτη και ένα ακόμη προδιαθεσικό για αθηρωμάτωση παράγοντα κινδύνου, η αποτελεσματικότητα της ραμιπρίλης στη μείωση του intimal medial thickness (IMT) στις καρωτίδες, ως δείκτη αθηρωμάτωσης. Μετά από μια μέση περίοδο παρακολούθησης 4,5 ετών μετρήθηκε το IMT σε 12 σημεία των καρωτίδων και έγινε σύγκριση των δύο ομάδων. Η ομάδα που ελάμβανε 10 mg ραμιπρίλης παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση του IMT, κατά 32%, αποδεικνύοντας την ανασταλτική δράση του φαρμάκου στη διαδικασία της αθηρογένεσης.

### PROGRESS Trial Results Hypertensive versus Normotensive Patients



PROGRESS Collaborative Group. Lancet 2001;358:1033-41

Πίνακας 9: Μείωση των επεισοδίων ΑΕΕ στην ομάδα της περιδοπρίλης





## 4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΙΣΧΑΙΜΙΚΩΝ ΑΕΕ

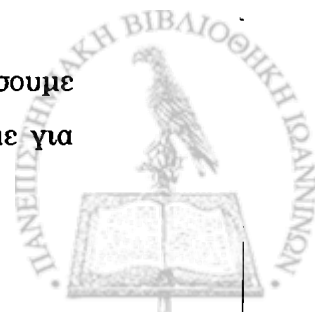
### 4.1. ΠΕΡΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Η ανάλυση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος, που αποτελείται από 3.5 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων DNA, αποτελεί σταθμό για την ανάπτυξη της ιατρικής έρευνας προς την κατεύθυνση της γονιδιοματικής ιατρικής. Η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γενετικού υλικού αποκάλυψε ένα σχετικά μικρό αριθμό γονιδίων (30.000-35.000) και κωδικοποιουσών περιοχών (<2%), σε σχέση με το σύνολο των νουκλεοτιδίων που αποτελούν το γένωμα. Από το σύνολο των 30.000–50.000 γονιδίων μέχρι σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση νοσημάτων οφειλουμένων σε μεταλλάξεις, που διαταράσσουν την έκφραση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν.

Τα γενετικά νοσήματα διακρίνονται σε: α) χρωμοσωματικά, β) μονογονιδιακά γ) μιτοχονδριακά και δ) πολυπαραγοντικά- πολυγονιδιακά. Τα χρωμοσωματικά είναι συχνότερα σποραδικά, σε αντίθεση με τα μονογονιδιακά, που είναι στη πλειοψηφία τους κληρονομούμενα, ενώ ένα μικρό ποσοστό μονογονιδιακών νοσημάτων εμφανίζεται λόγω νέων μεταλλάξεων.

Τα περισσότερα νοσήματα στον άνθρωπο θεωρούνται πολυπαραγοντικά και πολυγονιδιακά και οφείλονται σε ένα συνδυασμό γενετικών σφαλμάτων, που συνολικά μπορούν να προδιαθέσουν στην ανάπτυξη μιας νόσου, συνήθως υπό την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα πολυπαραγοντικά- πολυγονιδιακά νοσήματα έχουν την τάση να εμφανίζονται σε οικογένειες, αλλά χωρίς τα αυστηρά χαρακτηριστικά της Μενδελιανής κληρονόμησης. Η μεταβίβασή τους εμφανίζει αισθητά χαμηλότερα ποσοστά κινδύνου επανάληψης σε σχέση με τα αυτοσωματικά υπολειπόμενα νοσήματα (<25%), όμως δεν μπορεί σε καμία περίπτωση να θεωρηθεί αμελητέα. Οι όροι πολυπαραγοντική και πολυγονιδιακή κληρονόμηση χρησιμοποιείται πλέον με σχεδόν ταυτόσημο τρόπο.

Επειδή με την υπάρχουσα τεχνολογία είναι αδύνατον να αναλύσουμε ολόκληρη την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων κάθε ατόμου που μελετάμε για



ένα συγκεκριμένο νόσημα, χρησιμοποιούμε την πληροφορία που μας δίνουν πολύτιμοι πολυμορφικοί δείκτες, που βρίσκονται διάσπαρτοι στο γένωμα. Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις, οι πολυμορφισμοί δεν σχετίζονται άμεσα με κάποιο συγκεκριμένο νόσημα.

Γενετικός πολυμορφισμός ονομάζεται κάθε παραλλαγή της αλληλουχίας του γονιδιώματος που διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο. Η συχνότητα αυτών των παραλλαγών υπολογίζεται στο 0.1% της αλληλουχίας των 3.5 δισεκατομμυρίων ζευγών βάσεων του ανθρώπινου DNA. Υπάρχουν διάφορα είδη πολυμορφισμών, όπως α) οι σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs), β) οι πολυμορφισμοί ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων (VNTRs), με δύο υποκατηγορίες τους μινιδορυφορικούς (minisatellites) με επαναλήψεις από 10 ως 60 βάσεις και τους μικροδορυφορικούς (microsatellites) με επαναλήψεις 2,3,4, ή 5 νουκλεοτιδίων.

Οι σημειακοί πολυμορφισμοί αποτελούν την πλειοψηφία των ανθρώπινων πολυμορφισμών και απαντώνται με συχνότητα ενός περίπου πολυμορφισμού ανά 1000 ζεύγη βάσεων. Οι πολυμορφισμοί αυτού του τύπου αναγνωρίζονται συνήθως από περιοριστικά ένζυμα. Ένας σημειακός πολυμορφισμός πρέπει να έχει συχνότητα μεγαλύτερη από 1%, ενώ αν η σημειακή υποκατάσταση έχει μικρότερη συχνότητα ονομάζεται σπάνια παραλλαγή ή μετάλλαξη. Η μεγάλη πλειοψηφία των πολυμορφισμών δεν επηρεάζει την έκφραση, τη λειτουργία, ή την δομή των γονιδίων και των πρωτεϊνών που αυτά κωδικοποιούν. Οι σημειακοί πολυμορφισμοί έχουν συνήθως μικρή επίπτωση ή έχουν ουδέτερη συμπεριφορά, όμως σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατό να επηρεάσουν τη ρύθμιση, τη συναρμογή και την ωρίμανση του mRNA, όπως και την δομή της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης.

Η μελέτη των πολυπαραγοντικών νοσημάτων βασίζεται στη μελέτη των σημειακών πολυμορφισμών, της γενετικής σύνδεσης και των συσχετίσεων τους με αυτά. Ο εντοπισμός των πολυμορφισμών, που συμβάλλουν στην εμφάνιση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων, έχει ιδιαίτερη δυσκολία σε σχέση με την ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα μονογονιδιακά νοσήματα. Έχει όμως μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, αν λαβεί κανείς υπόψιν του τη συχνότητα και την επίπτωση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων στη δημόσια υγεία.

Δύο κυρίως μεθοδολογικές προσεγγίσεις εφαρμόζονται για τη συστηματική γενετική ανάλυση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων :



1. Οι απλές μελέτες συσχέτισης (association studies), που αποτελούν και την πλειοψηφία.
2. Οι μελέτες ανάλυσης της γενετικής σύνδεσης (linkage studies).
3. Οι μελέτες συσχέτισης του συνόλου του γονιδιώματος – μελέτες σάρωσης.

Οι μελέτες συσχέτισης χρησιμοποιούνται συχνότερα για την αναγνώριση της γενετικής επίπτωσης στα πολυπαραγοντικά νοσήματα. Με αυτή τη μεθοδολογία συγκρίνονται οι συχνότητες των αλληλομόρφων ενός συγκεκριμένου πολυμορφισμού μεταξύ των πασχόντων και των υγιών (ή μη πασχόντων) ενός πληθυσμού, σε αντίθεση με την ανάλυση γενετικής σύνδεσης στην οποία μελετούνται τα μέλη οικογενειών για τον εντοπισμό ενδεχόμενης μεταβίβασης του υπεύθυνου γονιδίου.

Οι μελέτες συσχέτισης γίνονται για τη διερεύνηση της εμπλοκής γονιδίων που σύμφωνα με την παθοφυσιολογία της εξεταζόμενης νόσου θεωρούνται υποψήφια. Οι μελέτες αυτές έχουν εφαρμογή κυρίως στη διερεύνηση νοσημάτων, των οποίων το μοντέλο κληρονομιάς δεν είναι εμφανές ή στα νοσήματα με ετερογενή φαινότυπο. Η απόδειξη ότι κάποιο αλληλόμορφο ή γονότυπος, έχει μεγαλύτερη ή μικρότερη συχνότητα στα πάσχοντα άτομα σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό αποτελεί συγχρόνως και σαφή ένδειξη για την εμπλοκή του υποψήφιου γονιδίου.

Μια θετική συσχέτιση μπορεί να οφείλεται σε τέσσερις κυρίως λόγους :

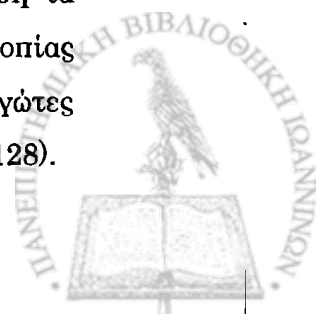
Α. Στο ότι ένα αλληλόμορφο είναι πράγματι ο μοναδικός παθογενετικός παράγοντας ή μέρος ενός συνόλου παραγόντων.

Β. Στο ότι ένα αλληλόμορφο βρίσκεται σε ισχυρή σύνδεση (ανισορροπία σύνδεσης= δεν ανασυνδυάζεται τυχαία) με γενετική θέση που προκαλεί το νόσημα.

Γ. Σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ιδίως όταν ο πληθυσμός της μελέτης είναι ετερογενής.

Δ. Όταν ένας πληθυσμός είναι ομοιογενής, κάθε συχνό χαρακτηριστικό θα μπορούσε να έχει ψευδώς θετική συσχέτιση με κάθε συχνό αλληλόμορφο.

Ένας τρόπος αποφυγής των ψευδώς θετικών συσχετίσεων, που οφείλονται στην ετερογένεια, είναι εφαρμογή μοντέλων μελέτης με βάση τα μέλη των οικογενειών. Παράδειγμα αποτελεί η ανάλυση ανισορροπίας μεταβίβασης αλληλομόρφων, κατά την οποία ελέγχεται αν οι ετεροζυγώτες γονείς μεταφέρουν το υπεύθυνο αλληλόμορφο στα πάσχοντα παιδιά τους (128).



Οι μελέτες ανάλυσης της γενετικής σύνδεσης βοηθούν στον εντοπισμό της θέσης των υπεύθυνων γονιδίων και στην συνακόλουθη απομόνωση και ταυτοποίηση τους. Οι πολυμορφικοί δείκτες χρησιμοποιούνται εδώ λόγω της συνκληρονόμησής τους με τη γενετική θέση που προκαλεί το νόσημα. Βασίζεται στη γνώση ότι οι γενετικές θέσεις που βρίσκονται πολύ κοντά δεν ανασυνδυάζονται κατά τη μείωση και συνκληρονομούνται. Επειδή η γενετική απόσταση του πολυμορφικού δείκτη και του υπεύθυνου γονιδίου δεν είναι γνωστή, η πιθανότητα του ανασυνδυασμού τους χρησιμοποιείται ως το αδρό μέτρο της απόστασής τους. Αυτή η συγκεκριμένη προσέγγιση είναι απαλλαγμένη από προηγούμενες επαγωγικές υποθέσεις περί της θέσης και του ρόλου των γονιδίων σε σχέση με το υπο μελέτη νόσημα. Η ανάλυση της γενετικής σύνδεσης έχει συμβάλει τα μέγιστα στη μελέτη των μονογονιδιακών νοσημάτων. Όμως η σημασία της στα πολυπαραγοντικά νοσήματα περιορίζεται από τη μεγάλη ετερογένεια του γονοτύπου (της γενετικής βάσης) και του φαινοτύπου (της κλινικής εικόνας) αυτών των νοσημάτων.

Οι μελέτες συσχέτισης του συνόλου του γονιδιώματος – μελέτες σάρωσης επιτρέπουν τη σάρωση του γονιδιώματος χωρίς προηγούμενη υπόθεση ή προκατάληψη και έτσι επιτρέπουν τον εντοπισμό απολύτως νέων γονιδιακών προδιαθεσικών παραγόντων.

## 4.2. ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΕΕ

Εκτός των γνωστών προδιαθεσικών παραγόντων στην πρόκληση ΑΕΕ, φαίνεται να υπάρχουν και γονιδιακοί επιβαρυντικοί παράγοντες, που σε συνδυασμό με τους περιβαλλοντικούς αυξάνουν την επίπτωση των επεισοδίων (129). Μελέτες παρακολούθησης, συσχέτισης, επιδημιολογικές μελέτες και μελέτες διδύμων υποστηρίζουν κάποιο μοντέλο κληρονομικότητας στην προδιάθεση για ανάπτυξη αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (130). Εκτός των σπάνιων μενδελειανών, όπως το CADASIL (Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy), που οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο Notch 3 και κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατητικό τύπο, τη νόσο του Fabry και των μιτοχονδριακών συνδρόμων, όπως το MELAS (Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes), που συνδυάζονται με πρόκληση ΑΕΕ σε σχετικά νεαρή ηλικία (131), η μοριακή βάση για την κληρονομούμενο κίνδυνο για



ανάπτυξη ΑΕΕ παραμένει άγνωστη και υπό μελέτη. Με δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία, όπου υποστηρίζεται ότι το θετικό οικογενειακό ιστορικό αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου και στους διδύμους η εμφάνιση ΑΕΕ στον ένα διπλασιάζει έως τετραπλασιάζει την πιθανότητα εμφάνισης και στον άλλο δίδυμο αδερφό παρόμοιου επεισοδίου (132), αποδεικνύεται η αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών επιβαρυντικών παραγόντων. Η δυνατότητα ανεύρεσης ασθενών που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο να υποστούν ΑΕΕ, μέσω προσδιορισμού του γενετικού τους υλικού με γενετικές δοκιμασίες, θα μπορούσε να οδηγήσει σε ουσιαστικά βήματα τόσο σε επίπεδο πρωτογενούς όσο και δευτερογενούς πρόληψης.

Τα γονίδια, που έχουν μελετηθεί και συνεχίζουν να μελετούνται και των οποίων μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί μπορούν να ευθύνονται για αυξημένη επίπτωση ΑΕΕ στα άτομα που τα φέρουν, μπορούν να ταξινομηθούν σε επτά ομάδες και συγκεκριμένα α) στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης β) στην αιμόσταση και στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης γ) στο σύστημα παραγωγής νιτρικού οξειδίου δ) στο μεταβολισμό των λιπιδίων ε) στα γονίδια των μορίων προσκόλλησης στ) στα γονίδια που σχετίζονται με τη φλεγμονή και το ανοσοποιητικό σύστημα και ζ) στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη φωσφοδιεστεράση. Συγκεκριμένα βρέθηκε γενετική σύνδεση ενός γονιδίου, που κωδικοποιεί τη φωσφοδιεστεράση 4D (PDE4D), γνωστού ως stroke gene, με τα ισχαιμικά ΑΕΕ σε μεγάλη ομάδα ασθενών, που συγκρίθηκε με υγιή πληθυσμό, από την Ισλανδία. Το PDE4D είναι ένας κύριος ρυθμιστής των ενδοκυττάρων επιπέδων του cAMP και εκφράζεται σε μια πλειάδα ιστών. Το PDE4D έχει συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, οι οποίοι καθορίζουν την έκφραση ορισμένων ισομορφών και που φαίνεται να συσχετίζονται με την αυξημένη επίπτωση ΑΕΕ (133,134).

Σε σχέση με τους πολυμορφισμούς ένθεσης/ελλείμματος (Insertion/Deletion) του ACE του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS), το D αλληλίο συσχετίζεται με αυξημένη επίπτωση ΙΑΕΕ, αυξημένη θνητότητα μετά από ΙΑΕΕ, παρουσία αθηρωματικών πλακών στις καρωτίδες και βλάβη μικρών αγγείων. Σε ότι αφορά στους λοιπούς πολυμορφισμούς του συστήματος RAS και συγκεκριμένα στο AGT/M325T, στους πολυμορφισμούς A116C του AT1 υποδοχέα και C3123A του AT2 υποδοχέα υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, που τους συσχετίζουν με την εμφάνιση βλαβών μικροαγγειοπάθειας στον εγκέφαλο (135,136,137,138,139).



Σε σχέση με τη θρομβοφιλία και το μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης, τα τελευταία χρόνια μια σειρά από μεταλλάξεις ενοχοποιούνται για ένα σύνολο νοσημάτων, τα οποία προκαλούνται από τη διαταραχή της αιμοστατικής ισορροπίας μεταξύ πήξης και ινωδολύσης. Οι συχνότερες αυτοσωμικές μεταλλάξεις, οι οποίες σε μελέτες εμπλέκονται με την πρόκληση ΙΑΕΕ, είναι η μετάλλαξη G1691A (Leiden) και η H1299R του παράγοντα V, η μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης (παράγοντας II), ο πολυμορφισμός του PAI-1 (4G/5G) και η μετάλλαξη του γονιδίου της αιμοχρωμάτωσης C282Y. Πλούσια είναι η βιβλιογραφία που αποσκοπεί στο να προσδιορίσει το αν ο παράγοντας V Leiden G1691A, η μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης, και το MTHFR (C677T) αποτελούν μόνοι τους ή σε συνδυασμό μεταξύ τους ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου (140,141,142, 143,144). Όσον αφορά στον πολυμορφισμό PAI -1 βρέθηκε ότι ο γονότυπος 4G/4G συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης ΙΑΕΕ (145,146) και εμφάνιση ΑΕΕ σε ασθενείς με στένωση των καρωτίδων (147) αν και σε κάποιες άλλες μελέτες αυτό δεν επιβεβαιώθηκε (148) ή ακόμη βρέθηκε να δρα προστατευτικά σε ηλικιωμένα άτομα (149). Για τη μετάλλαξη του γονιδίου της αιμοχρωμάτωσης C282Y και τα ΙΑΕΕ υπάρχει φτωχή βιβλιογραφική αναφορά, η οποία δεν το συσχετίζει με αυξημένη επίπτωση ΙΑΕΕ, παρά μόνο στην ομάδα των καπνιστών (150,151).

Για το νιτρικό οξείδιο, μελέτες, που αφορούν τη συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (NOS), συσχετίζουν πολυμορφισμούς, όπως ο NOS3 Glu298Asp πολυμορφισμός, με την πρόκληση ΑΕΕ και εμφραγμάτων (152,153).

Για την ομάδα των γονιδίων, που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων, φαίνεται ότι το αλληλίο ε4 και ο γονότυπος ε3ε2 μπορεί να αποτελούν παράγοντες κινδύνου στην πρόκληση ΑΕΕ ή αυξημένου IMT (154,155,156). Επίσης έχει βρεθεί σημαντική σχέση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς του ESR1 και της εμφάνισης ΑΕΕ (157,158). Οι πολυμορφισμοί του συγκεκριμένου γονιδίου φαίνονται επίσης να σχετίζονται με την ηλικία εμφάνισης ισχαιμικών ΑΕΕ και το φύλο των προσβεβλημένων ατόμων, ενώ σημαντικά στοιχεία προκύπτουν και με την περαιτέρω ανάλυση των διπλοτύπων των δύο σημαντικότερων πολυμορφισμών του γονιδίου (158,159,160). Η βιβλιογραφία έχει επίσης ασχοληθεί με τους πολυμορφισμούς της παραοξονάσης PON1, με κάποιες μελέτες να αναδεικνύουν το PON 192RR



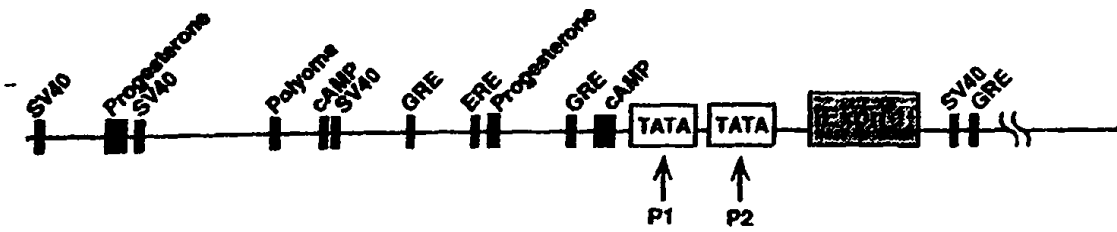
γονότυπο να συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης ΑΕΕ σε νεαρές ηλικίες (161).

Αναφορικά με τα γονίδια των μορίων προσκόλλησης και τα γονίδια που σχετίζονται με τη φλεγμονή και το ανοσοποιητικό σύστημα, μελέτες έχουν ασχοληθεί με διάφορους πολυμορφισμούς, όπως τα γονίδια των μορίων προσκόλλησης VCAM1 και ICAM1 (162). Σε άτομα με δρεπανοκυταρκή αναιμία έχουν επίσης διερευνηθεί γονίδια μορίων φλεγμονής (IL4R) και γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος (HLA-A, HLA-DPB1, HLA homozygosity), οι οποίοι είναι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες στην πρόκληση ισχαιμικών ΑΕΕ (163).

### **4.3. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΕΝΙΝΗΣ-ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ**

Το γονίδιο της ρενίνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (1q32-1q42). Το μέγεθός του είναι 12,5 kb και αποτελείται από 10 εξόνια και 9 ιντρόνια. Στο γονίδιο της ρενίνης υπάρχουν δυο εκκινητές (Γράφημα 6, TATA boxes), οι οποίοι είναι γνωστοί ως P1 και P2. Έχει βρεθεί πως τσ γονίδιο υπόκειται στον μεταγραφικό έλεγχο μόνο του P2 εκκινητή. Έχουν εντοπισθεί διάφοροι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της ρενίνης: TaqI και BglII πολυμορφισμοί στο 5' άκρο, Hind III πολυμορφισμοί στο 3' άκρο και Hindf I πολυμορφισμοί στο πρώτο ιντρόνιο.





RENIN (Human)



ANGIOTENSINOGEN (Human)



ANGIOTENSIN CONVERTING

### Γράφημα 6: Γονίδια συστήματος RAS

Το γονίδιο του ACE βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17q23). Το μέγεθός του είναι 21 kb και περιλαμβάνει 26 εξόνια. Το cDNA αποτελείται από 4020 bp. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί το μετατρεπτικό ένζυμο, μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 1306 αμινοξέα (164). Έχουν βρεθεί δύο εκκινητές, ένας σωματικός, ο οποίος εντοπίζεται στο '5 άκρο του πρώτου εξονίου του γονιδίου, και ένας σπερματικός εκκινητής. Ο σωματικός εκκινητής είναι ενεργός σε ενδοθηλιακά, επιθηλιακά και νευρικά κύτταρα ενώ ο σπερματικός είναι ενεργός μόνο σε συγκεκριμένο στάδιο των σπερματικών κυττάρων. Το γονίδιο του ACE μεταγράφει δυο διαφορετικά mRNAs: το ενδοθηλιακό και το σπερματικό.

Στο ιντρόνιο 16 του γονιδίου υπάρχει ο πολυμορφισμός I/D, ο οποίος αποτελείται από την παρουσία (Insertion=ένθεση) ή την απουσία (Deletion=έλλειψη) μιας 287bp επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Η απουσία





της αλληλουχίας αυτής σε ομόζυγη κατάσταση (DD) έχει βρεθεί να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα του ACE στον ορό (165). Πιθανώς ο γενετικός έλεγχος των επιπέδων του ACE να ασκείται κατά τη μεταγραφή ή ο πολυμορφισμός να βρίσκεται σε ανισοροπία σύνδεσης με ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου ή να βρίσκεται σε ανισοροπία σύνδεσης με ένα άλλο γονίδιο κοντά στη γενετική θέση του ACE.

Το γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου (AGT) βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 1 (1q42-43). Το μέγεθός του είναι 13 kb και περιλαμβάνει 5 εξόνια και 4 ιντρόνια. Κωδικοποιεί το αγγειοτενσινογόνο, μια πρωτεΐνη μεγέθους 55-60 kD. Στο εξόνιο 2, η σημειακή μετάλλαξη T→C του νουκλεοτιδίου 704 οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος μεθειονίνη από τη θρεονίνη (M235T) στο κωδικόνιο 235.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αγγειοτενσίνη II αλληλεπιδρά με δύο γνωστούς μεμβρανώδεις υποδοχείς, τύπου 1 (AT1R) και τύπου 2 (AT2R). Το γονίδιο του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II τύπου 1 (AT1) βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 3 (3q22). Το μέγεθός του είναι 55 kb, περιλαμβάνει 5 εξόνια και 4 ιντρόνια και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αποτελείται από 359 αμινοξέα. Τα 4 πρώτα εξόνια αποτελούν την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή ενώ στο εξόνιο 5 βρίσκεται η κωδικοποιούσα περιοχή μήκους 2268 bp. Στη μη κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου βρίσκεται ο πολυμορφισμός A1166C, που δε μεταβάλλει την ακολουθία των αμινοξέων στην κωδικοποιούσα πρωτεΐνη. Στην πολυμορφική αυτή θέση, η αδενίνη αντικαθίσταται από την κυτοσίνη στη θέση 1166 της ακολουθίας νουκλεοτιδίων του mRNA. Έρευνες έχουν δείξει πως ο πολυμορφισμός αυτός έχει επίδραση στην αρτηριακή πίεση. Το γονίδιο του AT2R έχει απομονωθεί στο X χρωμόσωμα.

Οι τρεις πολυμορφισμοί, που εντοπίζονται στο γονίδια του αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου (ACE), στο γονίδιο του αγγειοτενσινογόνου (AGT) και στο γονίδιο του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II τύπου 1 (AT1) (Εκόνα 12,13), έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε σχέση με την υπέρταση και την αθηρωμάτωση (139,166,167).



#### 4.4. I/D ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΕΝΙΝΗΣ-ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΕΕ



**Εικόνα 11:** Γονίδια του RAS και αθηρωμάτωση

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που προσπαθούν να συσχετίσουν την πρόκληση ΑΕΕ, τα καρδιαγγειακά συμβάντα και την αθηρωμάτωση με τους πολυμορφισμούς του συστήματος RAS (Εικόνα 11). Από τους τρεις πολυμορφισμούς, αυτός, που αναφέρεται στην πλειονότητα των μελετών και φαίνεται να εμπλέκεται σημαντικά στην πρόκληση ΑΕΕ και στην αθηρωμάτωση, είναι ο πολυμορφισμός I/D του ACE.

Ο γονότυπος του πολυμορφισμού αυτού φαίνεται βιβλιογραφικά να συσχετίζεται με τις τιμές του μετατρεπτικού ενζύμου στον ορό, εφόσον ομοζυγώτες ως προς το D αλληλίο έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετατρεπτικού ενζύμου με αποτέλεσμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της αγγειοτενσίνης II και συνεπώς ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (168).

Σε μελέτη όπου προσδιορίστηκε ο γονότυπος I/D του ACE σε 228 υπερτασικούς με και χωρίς lacunars στη MRI εγκεφάλου και 104 νορμοτασικούς ασθενείς, οι υπερτασικοί ασθενείς με lacunars είχαν αυξημένο ποσοστό του D αλληλίου σε σχέση με τους νορμοτασικούς, ενώ οι υπερτασικοί, χωρίς βλάβες στην MRI, δεν παρουσίαζαν καμιά διαφορά ως προς το γονότυπο



τους και τα αλληλόμορφα, που έφεραν, συγκρινόμενοι με τους νορμοτασικούς (169). Ενδιαφέροντα ευρήματα ήταν ακόμη η στατιστικά σημαντική παρουσία του D αλληλίου στους ασθενείς με πρώτο επεισόδιο ΑΕΕ πριν από την ηλικία των 60 ετών και η μείωση του D αλληλίου με την πάροδο της ηλικίας στους ασθενείς με ΑΕΕ (135). Για τη μείωση αυτή, δύο είναι οι πιθανές αιτίες: α. η μείωση της βιολογικής δράσης του συστήματος ρενίνης –αγγειοτενσίνης με την πάροδο της ηλικίας σε συνδυασμό με την αύξηση της εμφάνισης άλλων προδιαθεσικών παραγόντων, όπως είναι η υπέρταση και η δυσλιπιδαιμία και β. η πιθανότητα τα άτομα στα οποία επισυμβαίνει ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και που φέρουν το συγκεκριμένο αλληλίο να παρουσιάζουν αυξημένη θνητότητα, με αποτέλεσμα να μειώνεται το ποσοστό των ασθενών με το συγκεκριμένο γονότυπο με το πέρασμα του χρόνου. Αυξημένη θνητότητα σε ασθενείς που είχαν υποστεί ΑΕΕ και έφεραν το D αλληλίο αναφέρεται και σε άλλη μελέτη (136), η οποία επίσης συχέτισε την αυξημένη θνητότητα με μειωμένες τιμές μεταρεπτικού ενζύμου στο πλάσμα κατά την εμφάνιση του ισχαιμικού επεισοδίου.

Το D αλληλίο συσχετίστηκε επίσης με μικροϊσχαιμικές βλάβες της λευκής ουσίας του εγκεφάλου (137) και με την παρουσία αθηρωματικών πλακών στις καρωτίδες χωρίς να συσχετιστεί με την έκταση των πλακών ή με την παρουσία μικροϊσχαιμικού τύπου βλαβών (170). Συγκεκριμένα ο DD γονότυπος συσχετίστηκε με την εξωκρανιακή στένωση των καρωτίδων (138) και το αυξημένο intima media thickness (171,172). Σε άλλες εργασίες δεν επιβεβαιώθηκε σχέση του I/D πολυμορφισμού με την πρόκληση ΑΕΕ ή με το είδος των προκαλούμενων εγκεφαλικών επεισοδίων (139,173).

Συνοψίζοντας, στη βιβλιογραφία οι περισσότερες μελέτες αφορούν στους Insertion/Deletion πολυμορφισμούς του ACE. Σε μελέτες, ήδη από το 1996, γίνεται εκτίμηση για το αν το αλληλίο D φαίνεται να συσχετίζεται με την εμφάνιση ΑΕΕ σε νεαρή ηλικία (<60 ετών), την παρουσία μικροϊσχαιμικών βλαβών (lacunars), την αυξημένη θνητότητα μετά από αγγειακό ισχαιμικό επεισόδιο και την εμφάνιση αθηροσκληρωτικών πλακών στις καρωτίδες.



# *ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ*



# 1. ΣΤΟΧΟΙ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΝΤΑΞΗΣ

## 1.1. ΠΡΩΤΕΥΩΝ ΣΤΟΧΟΣ

Ο πρωτεύων στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της συσχέτισης ανάμεσα στους πολυμορφισμούς ένθεσης/ελλείμματος (Insertion/Deletion-I/D) του γονιδίου του αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου του συστήματος ρενίνης - αγγειοτενσίνης - αλδοστερόνης και την παρουσία ισχαιμικών βλαβών σε ασθενείς, που νοσηλεύτηκαν στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ).

## 1.2. ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΕΣ ΣΤΟΧΟΙ

Οι δευτερεύοντες στόχοι είναι η μελέτη της συχνότητας των συγκεκριμένων πολυμορφισμών σε σχέση με:

- Την εμφάνιση αγγειακών βλαβών των μικρών αγγείων (lacunars) ή των μεγάλων αγγείων του εγκεφάλου
- Την ηλικία των ασθενών
- Την ηλικία των ασθενών, όταν είχαν υποστεί το πρώτο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
- Το φύλο των ασθενών
- Τη βαρύτητα του επεισοδίου
- Το πάχος του έσω μέσου χιτώνα (intimal media thickness- IMT)
- Τη συνύπαρξη άλλων προδιαθεσικών παραγόντων
- Το μέσο βάρος σώματος - body mass index (BMI)

# 2. ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

## 2.1. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΝΤΑΞΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Τα κριτήρια ένταξης των ασθενών ήταν τα παρακάτω:



- Ενήλικες, οι οποίοι είχαν υποστεί ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, έως και 70 ετών και νοσηλεύτηκαν στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για το επεισόδιο αυτό.
- Το επεισόδιο αυτό ήταν τεκμηριωμένο κλινικά με ανεύρεση νευρολογικής σημειολογίας και εργαστηριακά με αξονική ή/και με μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου.
- Ο ανοσολογικός έλεγχος και ο πήκτολογικός έλεγχος των ασθενών ήταν αρνητικός.
- Οι ασθενείς δεν έπρεπε να πάσχουν από βαλβιδοπάθεια, αρρυθμία, καρδιακή ανεπάρκεια, μεσοκοιλιακή επικοινωνία ή να έχουν άλλη γνωστή εμβολογόνο εστία.
- Οι ασθενείς δεν έπρεπε να είχαν υποστεί OEM σε διάστημα μικρότερο του ενός μήνα από την πρόκληση του ισχαιμικού ΑΕΕ.

## **2.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Στη μελέτη εντάχθηκαν προοπτικά 176 ασθενείς, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ισχαιμικού τύπου στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, από το Δεκέμβριο του 2002 έως το Δεκέμβριο του 2005. Οι ασθενείς αυτοί παρακολουθήθηκαν στη συνέχεια στο Ειδικό Εξωτερικό Νευρολογικό Ιατρείο εγκεφαλικών επεισοδίων ως και το Δεκέμβριο του 2007.

Για να εκτιμηθούν περαιτέρω οι ασθενείς, να χωριστούν σε ομάδες και να εκτιμηθούν τα αποτελέσματα, χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment – Adams et al, 1993). Σύμφωνα με τα κριτήρια TOAST τα ισχαιμικά ΑΕΕ διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες: 1) στα αθηροσκληρωτικά ΑΕΕ με ισχαιμικό έμφρακτο των μεγάλων αγγείων, 2) στα καρδιοεμβολικά, 3) στην απόφραξη των μικρών αγγείων, τα γνωστά ως lacunars, 4) στα ΑΕΕ από άλλη γνωστή αιτιολογία και 5) στα ΑΕΕ από άγνωστη αιτιολογία.

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Ο διαχωρισμός έγινε με βάση τα απεικονιστικά ευρήματα (αξονική, μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου), το καρδιογράφημα, το υπερηχογράφημα της καρδιάς (διαθωρακικό ή διαοισοφάγειο, όπου κρίθηκε απαραίτητο), την εκτίμηση των θρομβωτικών παραγόντων, τα αποτελέσματα του ανοσολογικού ελέγχου και τον υπόλοιπο



παρακλινικό έλεγχο. Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε τους ασθενείς με ισχαιμικό έμφρακτο μεγάλου αγγείου και η δεύτερη ομάδα τους ασθενείς με απόφραξη των μικρών αγγείων, τα επονομαζόμενα lacunars, με διάμετρο της ισχαιμικής βλάβης μικρότερη των 15 mm στις απεικονίσεις του εγκεφάλου. Οι ασθενείς με καρδιοεμβολικά ΑΕΕ και αυτοί με άλλο γνωστό παράγοντα κινδύνου (πχ αντιφωσφολιπιδαιμικό σύνδρομο, ομοκυστειναιμία, αγγειίτιδα του ΚΝΣ) συστηματικές πηκτολογικές διαταραχές ή ανοσολογικά νοσήματα εξαιρέθηκαν. Οι ασθενείς, που παρά τον πλήρη εκτενή έλεγχο, δεν παρουσίαζαν εμβολογόνο εστία ή άλλη συστηματική διαταραχή, υπεύθυνη για την πρόκληση του ΑΕΕ, κατατάχθηκαν σε μία από τις δύο ομάδες με βάση τα απεικονιστικά ευρήματα. Αποκλείστηκαν ακόμη όσοι ήταν μεγαλύτεροι των 70 ετών, όσοι παρουσίαζαν αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο αιμορραγικού τύπου και όσοι δεν ολοκλήρωσαν τον έλεγχο προς αποκλεισμό εμβολογόνου εστίας, πηκτικής ή ανοσολογικής διαταραχής, είτε λόγω μη συμμόρφωσης στις οδηγίες μας είτε λόγω αντικειμενικών δυσκολιών.

Στους ασθενείς έγινε ακριβής καταγραφή της κλινικής τους εικόνας, που περιλάμβανε νευρολογική και φυσική εξέταση και μέτρηση της αρτηριακής πίεσης και των λοιπών ζωτικών σημείων.

Για την εκτίμηση της βαρύτητας της κλινικής τους εικόνας χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα Rankin Scale (Πίνακας 10).

Βαθμολογία	Συμπτωματολογία – Σημειολογία
0	Καθόλου συμπτωματολογία.
1	Χωρίς σημαντικό έλλειμμα. Μπορεί να εκτελέσει όλες τις συνηθισμένες δραστηριότητες.
2	Μικρό έλλειμμα. Δεν μπορεί να εκτελέσει όλες τις προηγούμενες συνηθισμένες του δραστηριότητες αλλά μπορεί να τακτοποιήσει τις προσωπικές του υποθέσεις.
3	Μέτριο έλλειμμα. Χρειάζεται υποστήριξη στις καθημερινές του δραστηριότητες αλλά μπορεί να περπατάει χωρίς βοήθεια.
4	Αρκετά σοβαρό έλλειμμα. Δεν μπορεί να περπατάει χωρίς βοήθεια.
5	Σοβαρό έλλειμμα, μονίμως κατακεκλιμένος. Χρειάζεται διαρκή φροντίδα και υποστήριξη.



Πίνακας 10: Κλίμακα Rankin Scale

Από το ιστορικό των ασθενών, αναζητήσαμε την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου, την πρόκληση εμφράγματος του μυοκαρδίου, την πρόκληση προηγούμενου εγκεφαλικού επεισοδίου, την ηλικία που το πρώτο αυτό ΑΕΕ προκλήθηκε και το θετικό οικογενειακό ιστορικό. Ως θετικό οικογενειακό ιστορικό ορίστηκε η ύπαρξη συγγενών πρώτου βαθμού με πρόκληση καρδιοαγγειακού ή εγκεφαλικού ισχαιμοκού συμβάντος πριν από την ηλικία των 65 ετών για τις γυναίκες και 55 για τους άντρες συγγενείς 1<sup>ου</sup> βαθμού. Επίσης αναζητήθηκε η ύπαρξη υπέρτασης, σαχαρώδη διαβήτη, δυσλιπιδαιμίας και παχυσαρκίας και καταγράφηκαν έξεις, όπως το κάπνισμα, που θεωρούνται προδιαθεσικοί παράγοντες πρόκλησης ΑΕΕ.

Σε επείγουσα βάση διενεργήθηκε σε όλους τους ασθενείς αξονική τομογραφία, η οποία και απέκλεισε στην οξεία φάση την ύπαρξη αιμορραγικού ΑΕΕ. Σε τακτική βάση διενεργήθηκε μαγνητική τομογραφία, προκειμένου να απεικονιστεί το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο σε όλη του την έκταση και να αναδειχθούν καλύτερα μικροϊσχαιμικού τύπου αγγειακές βλάβες, τα γνωστά lacunars. Σε ασθενείς, όπου αντενδείκνυτο η διενέργεια μαγνητικής τομογραφίας (ύπαρξη ασύμβατων υλικών μετά από επέμβαση για παράδειγμα) διενεργήθηκε και δεύτερη αξονική τομογραφία εγκεφάλου.

Στους ασθενείς έγινε αναλυτική καταγραφή της αρτηριακής πίεσης, πλήρους αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος και έλεγχος του λιπιδαιμικού profil. Επίσης έγινε μέτρηση του σωματικού βάρους και του ύψους και υπολογισμός του BMI, ο οποίος υπολογίστηκε ως βάρος (kg) / ύψος<sup>2</sup> (m)<sup>2</sup>. Οι τιμές γλυκόζης του αίματος εκτιμήθηκαν και όπου ήταν αναγκαίο διενεργήθηκε καμπύλη γλυκόζης του πλάσματος

Στους ασθενείς ζητήθηκε καρδιολογική εκτίμηση, η οποία περιλάμβανε απλή καρδιολογική εξέταση και διενέργεια καρδιογραφήματος. Όπου κρίθηκε απαραίτητο ο έλεγχος ήταν πιο εκτενής με υπερηχογράφημα καρδιάς, διαθωρακικό ή διαοισοφάγειο και τοποθέτηση Holter ρυθμού και αποκλείστηκαν οι ασθενείς με εμβολογόνο εστία και κολπική μαρμαρυγή.

Πλήρης ανοσολογικός έλεγχος και μέτρηση των πρωτεϊνών C, S, και C-Resistance στάλθηκε σε όλους τους ασθενείς και αποκλείστηκαν εκείνοι με ανοσολογική διαταραχή ή διαταραχή του πήκτολογικού μηχανισμού.





Σε σχέση με τις λοιπές παρακλινικές εξετάσεις, εκτός της αξονικής τομογραφίας, που διενεργήθηκε σε επείγουσα βάση σε όλους τους ασθενείς και την προγραμματισμένη μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου, διενεργήθηκε και Triplex καρωτίδων με μέτρηση του πάχους του μέσου χιτώνα - Intima Media Thickness (IMT). Έτσι εκτιμήθηκε η γενικότερη διαδικασία της αθηρωμάτωσης, με την εκτίμηση της βατότητας των αγγείων και του οιδήματος του ενδοθηλίου.

Συνοψίζοντας στους ασθενείς που εντάχθηκαν στη μελέτη έγιναν οι παρακάτω παρακλινικές εξετάσεις:

- Αιματολογικός έλεγχος (Ht, Hb, Wbc)
- Μέτρηση των τιμών GLC, CHOL, TRG, HDL
- Ήπατικός, νεφρικός έλεγχος
- Ηλεκτρολύτες
- Καρδιακά ένζυμα (CK-MB)
- Παράμετροι φλεγμονής (CRP, TKE)
- Πηκτικότητα (Pt, aPTT, PT/INR)
- Ειδικός ηηκτολογικός έλεγχος (πρωτεΐνη C,S,C-Resistance, Prothrombin) και αντιφωσφολιπιδαιμικά αντισώματα
- Ανοσολογικός έλεγχος
- Καμπύλη γλυκόζης και μέτρηση της ινσουλίνης
- ΗΚΓ
- Μέτρηση της αρτηριακής πίεσης
- CT εγκεφάλου στην οξεία φάση
- MRI εγκεφάλου σε 30 περίπου ημέρες από το επεισόδιο
- Triplex αγγείων τραχήλου με μέτρηση του IMT
- Μέτρηση σωματικού βάρους και υπολογισμός του BMI
- U/S καρδιάς διαθωρακικό ή διαοισοφάγειο
- Holter ρυθμού
- Εξαγωγή του DNA
- Προσδιορισμός συχνοτήτων των πολυμορφισμών του RAS με PCR.

Στην ομάδα των Controls εντάχθηκαν 178 άτομα παρόμοιου φύλου και ηλικίας, χωρίς γνωστό ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στη Νευρολογική Κλινική ή επισκέφθηκαν τα εξωτερικά ιατρεία της Κλινικής για κάποια άλλη, εκτός ΑΕΕ, διαταραχή ή νόσημα. Στην ομάδα αυτή, εκτός της καταγραφής του φύλου και της ηλικίας, καταγράφηκαν



οι συνηθισμένοι προδιαθεσικοί παράγοντες πρόκλησης ισχαιμικού ΑΕΕ και συγκεκριμένα η παρουσία υπέρτασης, δυσλιπιδαιμίας, σακχαρώδη διαβήτη και το κάπνισμα.

## 3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

### 3.1. ΕΞΑΓΩΓΗ DNA

#### 3.1.1 ΑΡΧΕΣ ΕΞΑΓΩΓΗΣ DNA

Η εξαγωγή DNA έγινε από λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος με την εξής διαδικασία: Σε erpendorf (1,5 ή 2ml) προστίθενται 700μl αίμα, 700 μl TKM και δύο σταγόνες IGEPAL προκειμένου να λυθούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Το μίγμα αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό. Ακολούθως, εφόσον αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, στο ίζημα προστέθηκε 500 μl TKM και ακολούθησε ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές. Επαναλήφθηκε η διαδικασία, 3-4 φορές περίπου, μέχρι το ίζημα να απαλλαχθεί από τα ερυθρά και να γίνει λευκό. Στο λευκό ίζημα, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 200 μl TKM υπό ανάδευση, ώστε να σπάσει το ίζημα και κατόπιν προστέθηκε 15 μl SDS 10%.

Ανακατεύθηκε ήπια το μίγμα και τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 55°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε 85 μl NaCl 6M, αναδεύτηκε καλά και φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 στροφές για 3 λεπτά.

Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο erpendorf και σε αυτό προστέθηκε 750μl απόλυτης αιθανόλης -20° C. Μετά από προσεκτική ήπια ανάδευση η αιθανόλη απομάκρυνε τα μόρια του νερού από το διαλελυμένο DNA, το οποίο απέκτησε την μορφή λευκού επιπλέοντος νηματώδους υλικού ορατό μακροσκοπικά. Τέλος το DNA συλλέχθηκε και διαλύθηκε σε 50 μl TE. Με τη μορφή αυτή φυλάχθηκε στους 4° C.

#### Σύσταση διαλυμάτων

- TKM: 10 mM Tris-HCl (pH=7,6),  
10 mM KCl,  
2mM EDTA,



4mM MgCl<sub>2</sub>,

- IGEPAL: (Sigma)
- NaCl: 6M
- SDS: Sodium dodecyl sulphate 10% (Sigma)
- TE: 10 mM Tris-HCl (pH=7,8),  
2mM EDTA (Ph=8)

## 3.2. PCR

### 3.2.1 APXEΣ PCR

Με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), μια ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αντιγραφεί εκθετικά με πιστότητα, ταχύτητα και εκλεκτικότητα από οποιοδήποτε δείγμα DNA την περιέχει.

Η μέθοδος PCR βασίζεται στη χρήση του ενζύμου της DNA πολυμεράσης, η οποία απομονώνεται από θερμόφιλο βακτήριο και είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες (90-98°C), για τον πολλαπλασιασμό ενός εκμαγείου DNA σε επανειλημμένους κύκλους αντιγραφής. Το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία, που επιδιώκεται να αντιγραφεί, από ολιγονουκλεοτίδια που δρουν ως εκκινητές (primers) τα οποία υβριδοποιούνται στο 5' και των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA και καθορίζουν το τμήμα του DNA που θα αντιγραφεί σε κατεύθυνση 5'→3'. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε καθένας να είναι συμπληρωματικός με την αλληλουχία ενός κλώνου της δίκλωνης αλυσίδας του DNA της επιλεγμένης περιοχής.

Η κυκλοποίηση βασίζεται στην αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA και κάθε κύκλος της αντίδρασης ξεκινάει με βραχεία θέρμανση κοντά στη θερμοκρασία βρασμού, ώστε να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι. Μετά την αποδιάταξη των δύο κλώνων η θερμοκρασία του μείγματος της αντίδρασης ελαττώνεται, οπότε οι εκκινητές, που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια, μπορούν να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δύο κλώνους του DNA. Στη συνέχεια το μείγμα επωάζεται με την DNA πολυμεράση και τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTP's), οπότε συντίθεται DNA με αρχή το 5' άκρο των εκκινητών. Εν συνεχεία, ο



κύκλος αρχίζει ξανά με άνοδο της θερμοκρασίας, έτσι ώστε να διαχωριστούν οι νέοσυντεθειμένοι κλώνοι του DNA.

Καθώς η όλη διεργασία διεξάγεται επαναληπτικά, τα νέοσυντεθειμένα κλάσματα λειτουργούν με τη σειρά τους ως εκμαγεία και μέσα σε μερικές δεκάδες κύκλους επικρατεί το επιλεγμένο τμήμα DNA, το οποίο είναι πανομοιότυπο με την αλληλουχία που περιγράφεται από τους εκκινητές στο αρχικό εκμαγείο. Για μια επιτυχή ποσοτική αύξηση του γενωμικού DNA, που έχει εξαχθεί με την ανωτέρω μεθοδολογία, απαιτούνται 20-30 κύκλοι.

Για την επιτυχή πορεία των πειραμάτων είναι αναγκαίος ο καθαρισμός του χώρου εργασίας, των πιπेटών που χρησιμοποιούνται και των χεριών με αιθανόλη για να αποφεύγονται επιμολύνσεις των δειγμάτων. Χρησιμοποιούνται μόνο αποστειρωμένα tips και tubes.

### **3.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ PCR**

Σε eppendorf προστέθηκαν όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το DNA, με πρώτο το απεσταγμένο και απιονισμένο νερό. Τα αντιδραστήρια φυλάσσονταν στους  $-24^{\circ}\text{C}$  και αναμειχθηκαν σε ένα αρχικό μείγμα με όγκο πολλαπλάσιο του όγκου της μίας αντίδρασης και ανάλογο του αριθμού των δειγμάτων προς ανάλυση. Τα ιόντα  $\text{Mg}^{2+}$  σχημάτισαν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTP's για να παράγουν το ενεργό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση

ACE I/D	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
DNA	1μl
10x Buffer	2,5μl
2mM dNTP's	2,5μl
10pmol/μl prF 10pmol/μl	1μl
10pmol/μl prR 10pmol/μl	1μl
50μM $\text{MgCl}_2$	1μl
DMSO 5%	1,25μl
Taq Polymerase	0,25μl
Dd H <sub>2</sub> O	14,5μl
Σύνολο	25μl



Οι εκκινητές (primers prF,-prR) και οι συνθήκες κυκλοποίησης ήταν σύμφωνες με την αρχική μελέτη ταυτοποίησης των αλληλομόρφων ACE I/D (174).

### **3.2.3. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΣΗΣ**

Αρχικά έγινε αποδιάταξη στους 94° C για 10 λεπτά.

Ακολούθησε:

- αποδιάταξη (denaturation) στους 94° C για 45 δευτερόλεπτα.
- υβριδοποίηση (annealing) στους 58° C για 30 δευτερόλεπτα.
- σύνθεση (extension) 72° C για 45 δευτερόλεπτα.

Το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε για 30 κύκλους.

Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72 ° C, για 10 λεπτά.

Η συσκευή PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν: RCR (MJ RESEARCH) RTC-200 Peltier thermal Cycler.

## **3.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%**

### **3.3.1. ΑΡΧΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%**

Η ηλεκτροφόρηση αγαρόζης είναι μια τεχνική η οποία προσφέρεται για το διαχωρισμό μακρομορίων – ειδικά νουκλεϊκών οξέων – που διαφέρουν σε μέγεθος, φορτίο, μοριακό βάρος και διαμόρφωση. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι τα φορτισμένα μόρια, όταν τοποθετούνται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, μεταναστεύουν είτε προς το θετικό πόλο (κάθοδος) είτε προς τον αρνητικό πόλο (άνοδος), ανάλογα με το φορτίο τους. Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν αρνητικό φορτίο εξαιτίας του φωσφορικού άλατος που υπάρχει σε κάθε νουκλεοτίδιο και γι' αυτό μεταναστεύουν προς την κάθοδο.

Η αγαρόζη είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που εξάγεται από φύκια. Διατίθεται σε σκόνη και διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα (π.χ. TBE). Χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις 0,5 ως 3,5 %. Όσο υψηλότερη η συγκέντρωση αγαρόζης τόσο δύσκολότερα μετακινούνται τα μακρομόρια εντός της πηκτής.



Στην ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη, η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας ευκολότερο το διαχωρισμό μορίων DNA. Τα μόρια DNA με διαφορετικό μέγεθος διαχωρίζονται καθώς αυτά αναγκάζονται να κινηθούν μέσω της πηκτής, όταν εφαρμόζεται εξωτερική τάση. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα δια μέσω της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια (>20KB) μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες.

Οι ζώνες του DNA σε πηκτή αγαρόζης δε φαίνονται παρά μόνο με ειδική σήμανση. Μια ευαίσθητη μέθοδος βαφής του DNA είναι η έκθεσή του στη χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο, μια αρωματική χημική ουσία που προσδένεται μεταξύ των ζευγών βάσεων στη διπλή έλικα, η οποία φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως μόνο όταν συνδέεται με το DNA.

### **3.3.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%**

Σε μια κωνική φιάλη προστέθηκαν 100 ml TBE 1x. Στη συνέχεια διαλύθηκαν 2 gr αγαρόζης (σε μορφή σκόνης). Έπειτα θερμάνθηκε το διάλυμα έως ότου η αγαρόζη διαλύθηκε πλήρως και το διάλυμα έγινε διαυγές, χωρίς ίζημα. Τέλος προστέθηκε 5ml βρωμιούχο αιθίδιο, για να μπορούμε να δούμε τις ηλεκτροφορητικές ζώνες στο UV.

### **3.3.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Για να ελεγχθεί αν υπάρχουν προϊόντα PCR, μια μικρή ποσότητα του δείγματός ηλεκτροφορήθηκε σε gel αγαρόζης 2%.

Από τα 25 μl συνολικά κάθε μείγματος PCR, τοποθετήθηκαν 5 μl μαζί με 2 μl χρωστικής (loading buffer) στις ειδικές θέσεις που υπάρχουν στο ένα άκρο της πηκτής (πηγαδάκια). Η πηκτή βυθισμένη σε ένα διάλυμα (1x TBE), λειτουργούσε ως μέσο ρύθμισης του pH και διέλευσης του ρεύματος. Στη συνέχεια, ρυθμίστηκε η συσκευή ώστε η ένδειξη στο μετατροπέα εναλλασσόμενης τάσης να είναι 80 – 100 Volt, ο οποίος ηλεκτροδοτήθηκε για 30 λεπτά περίπου. Επειδή το DNA έχει αρνητικό φορτίο, τα κλάσματα DNA έπρεπε να μετακινηθούν προς το θετικό ηλεκτρόδιο.



Μαζί με τα προς εξέταση δείγματα, φορτώθηκε ένας marker ο οποίος εμφάνιζε διαδοχικές ζώνες γνωστού μεγέθους (ανά 50 ή 100 bp) και έτσι έγινε δυνατή η σύγκριση των γνωστών μοριακών βαρών με αυτές των δειγμάτων μας.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση του DNA ήταν: LIFE TECHNOLOGIES PS 3002 THERMO EC CLASSIC.

### **3.4. ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, το gel αγαρόζης μεταφέρθηκε στη συσκευή KODAK, η οποία ήταν συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και απαρτιζόταν από έναν θάλαμο με λάμπα UV και μία φωτογραφική μηχανή στο επάνω τμήμα του θαλάμου.

Κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR του ACE I/D μπορούσαμε να δούμε μία ή δύο ζώνες ανάλογα με τον πολυμορφισμό που υπήρχει στον κάθε ασθενή (Εικόνα 12). Τα αλληλόμορφα του ACE I/D είναι δύο, το αλληλόμορφο I με μέγεθος 490 bp και το αλληλόμορφο D, με μέγεθος 190 bp. Τα προϊόντα PCR εμφάνιζαν μία ζώνη ή δύο χώνες ανάλογα με την ομοζυγωτία ή την ετεροζυγωτία, ενώ τα blank δεν εμφάνιζαν προϊόν PCR. Ειδικά για τους ομοζυγώτες DD έγινε επανάληψη των αντιδράσεων PCR και της ηλεκτροφόρησης για να αποφευχθούν ενδεχόμενα σφάλματα ταξινόμησης των ετεροζυγωτών στους ομοζυγώτες (175).

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των προϊόντων PCR ήταν: KODAK EDAS 290.

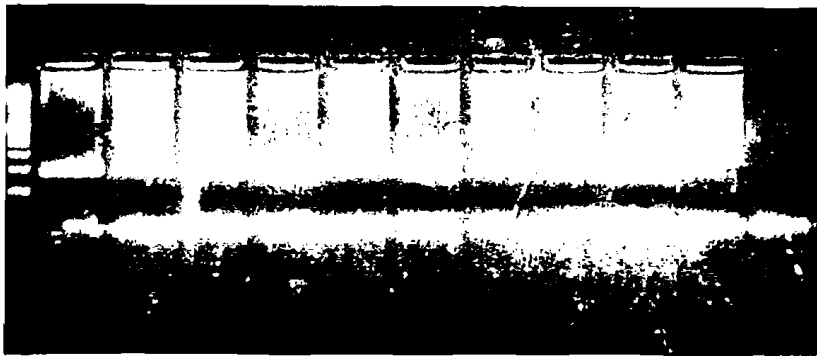
#### **Διαλύματα**

- TBE 10X (1lt): 108gr Trisbase, MW= 121.1
- 7.44 gr EDTA, MW=372.24
- 55gr Boric Acid,  $H_3BO_3$ . M=61.84, pH 3.3%  $H_2O$  3.8 – 4.8, extra pure.

#### **Για την ηλεκτροφόρηση DNA:**

- PCR Product 5  $\mu$ l
- Loading buffer 2  $\mu$ l





DD, ID, ID, DD, ID, DD, ID, ID, DD, II

*Εικόνα 12: ACE I/D (I 490bp, D 190bp)*

## 4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ακολούθησε συσχέτιση των μοριακών και κλινικών στοιχείων και επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η ομοιογένεια του κλειστού γεωγραφικά πληθυσμού της Ηπείρου εξυπηρέτησε τους σκοπούς της μελέτης και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για τη συχνότητα, την επίπτωση και το σχετικό κίνδυνο των πολυμορφισμών και του ΑΕΕ. Οι συχνότητες των γονιδιακών αλληλόμορφων στους μεμονωμένους γενετικούς τόπους εκτιμήθηκαν με καταμέτρηση. Η συμφωνία των γονοτυπικών συχνοτήτων με τις προσδοκίες ισορροπίας Hardy-Weinberg εξετάστηκε χρησιμοποιώντας την  $\chi^2$  ανάλυση. Τα  $p$ -values  $< 0,05$  τέθηκαν ως στατιστικά σημαντικά. Σε όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα StatXact 3.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τους 176 ασθενείς οι 60 ήταν γυναίκες και οι 116 άντρες ενώ στην ομάδα ελέγχου, σε σύνολο 178 ατόμων, οι 90 ήταν γυναίκες και οι 88 ήταν άντρες. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν 58,56 έτη (από 40 έως 70 έτη), για μεν τις γυναίκες 58,75 έτη, για δε τους άντρες 58,46 έτη. Οι συνηθέστεροι προδιαθεσικοί παράγοντες στην πρόκληση ισχαιμικού τύπου ΑΕΕ στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου φαίνονται στον Πίνακα 11.





Προδιαθεσικοί παράγοντες	Ασθενείς	Controls
Υπέρταση	144	130
Δυσλιπιδαιμία	111	99
Σακχαρώδης Διαβήτης	57	47
Κάπνισμα	74	85

**Πίνακας 11:** Προδιαθεσικοί παράγοντες στις ομάδες των ασθενών και των controls

Μετά την ολοκλήρωση του εργαστηριακού τμήματος της εργασίας, οι γονότυποι που προέκυψαν, τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα των controls, φαίνονται στον Πίνακα 12. Όπως γίνεται αντιληπτό, δεν προέκυψε κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα από τις συγκρίσεις σε ότι αφορά στους γονοτύπους αλλά και ούτε ως προς τα αλληλόμορφα I και D, όπως αναδεικνύεται από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον Πίνακα 13.

Κατανομή γονοτύπων	Ασθενείς	Controls
DD	61 (34,7%)	69 (38,8%)
ID	86 (48,9%)	81 (45,5%)
II	29 (16,4%)	28 (15,7%)

**Πίνακας 12:** Κατανομή γονοτύπων στις ομάδες των ασθενών και των controls

Κατανομή αλληλομόρφων	Controls	Ασθενείς
DD +ID (D αλληλόμορφο)	150	147
II+ ID (I αλληλόμορφο)	109	105

**Πίνακας 13:** Κατανομή αλληλομόρφων στις ομάδες των ασθενών και των controls



Με δεδομένα από τη βιβλιογραφία, όπως ήδη αναφέρθηκε, που θέλει σε κάποιες μελέτες να υπάρχει διαφορά στους γονοτύπους και στα αλληλόμορφα στις υποκατηγορίες των ισχαιμικών ΑΕΕ, προχωρήσαμε σε περαιτέρω ανάλυση ως προς τις δύο υποομάδες των ΑΕΕ. Η πρώτη ομάδα, που περιλάμβανε ασθενείς με ισχαιμικό έμφρακτο μεγάλου αγγείου, αριθμούσε 89 ασθενείς και η δεύτερη ομάδα, η ομάδα των lacunars, αριθμούσε 87 ασθενείς. Η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων στις δύο υποομάδες των ΑΕΕ φαίνονται στους Πίνακες 14 και 15.

Κατανομή γονοτύπων στις δύο ομάδες των ΑΕΕ	Νόσος των μεγάλων αγγείων	Lacunars
DD	30	31
ID	44	42
II	15	14

***Πίνακας 14: Κατανομή γονοτύπων στις δύο υποομάδες των ΑΕΕ***

Κατανομή αλληλομόρφων	Νόσος μεγάλων αγγείων	Lacunars
DD +ID (D αλληλόμορφο)	74	73
II+ ID (I αλληλόμορφο)	59	56

***Πίνακας 15: Κατανομή αλληλομόρφων στις δύο υποομάδες των ΑΕΕ***

Όπως μπορεί να γίνει αντιληπτό, από τα αποτελέσματα δεν προέκυψε στατιστική διαφορά από τις συγκρίσεις που έγιναν μεταξύ των δύο υποομάδων μεταξύ τους, μεταξύ των δύο υποομάδων και των controls και μεταξύ των δύο υποομάδων και του συνόλου των ασθενών. Τα p-values και τα OR όλων των προαναφερθεισών συγκρίσεων φαίνονται στον Πίνακα 16.



Συγκρίσεις	p-values	Odds Ratio
DD+ID vs II: ασθενείς/controls	0.848	0.946
II+ID vs DD: ασθενείς/controls	0.699	1.090
DD+ID vs II: lacuns/ νόσος μεγάλων αγγείων	0.891	1.057
DD vs II+ID: lacuns/ νόσος μεγάλων αγγείων	0.788	1.089
DD+ID vs II: νόσος μεγάλ. αγγείων/ασθενείς	0.938	0.938
DD+ID vs II: lacuns/ ασθενείς	0.936	1.029
II+ID vs DD: νόσος μεγάλ. αγγείων /ασθενείς	0.877	1.043
II+ID vs DD: lacuns/ασθενείς	0.980	0.993
DD+ID vs II: lacuns/ controls	0.939	0.973
DD+ID vs II: νόσος μεγάλ. αγγείων / controls	0.813	0.921
II+ID vs DD: lacuns/controls	0.772	1.082
II+ID vs DD: νόσος μεγάλ.αγγείων/controls	0.420	1.245

***Πίνακας 16: p-values και OR***

Προκειμένου να βρεθεί αν κάποιος γονότυπος ή αλληλόμορφο σχετίζεται με τη συστηματική αθηρωμάτωση, χρησιμοποιήσαμε ως δείκτη αθηρωμάτωσης το intimal media thickness (IMT). Το IMT υπολογίστηκε στους 118 ασθενείς, εκ των οποίων οι 72 είχαν παθολογικό IMT και 46 φυσιολογικό. Τα αποτελέσματα της κατανομής των γονοτύπων αναδεικνύονται στον Πίνακα 17 και των αλληλομόρφων στον Πίνακα 18. Από τη στατιστική επεξεργασία δεν προέκυψαν, στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (DD+ID vs II,  $p=0.706$  και ID+II vs DD,  $p=0.757$ ).



Κατανομή γονοτύπων	IMT παθολογικό	IMT φυσιολογικό
DD	30	20
ID	30	18
II	12	8

**Πίνακας 17:** Κατανομή γονοτύπων σε ασθενείς με παθολογικό και φυσιολογικό IMT

Κατανομή αλληλομόρφων	IMT παθολογικό	IMT φυσιολογικό
DD +ID (D αλληλόμορφο)	60	38
II+ ID (I αλληλόμορφο)	42	26

**Πίνακας 18:** Κατανομή αλληλομόρφων σε ασθενείς με παθολογικό και φυσιολογικό IMT

Σε σχέση με την ηλικία των ασθενών, χωρίσαμε τους ασθενείς σε δύο ομάδες με όριο τη μέση ηλικία. Στην πρώτη ομάδα συμπεριλήφθηκαν 96 ασθενείς ηλικίας > 58 ετών και στη δεύτερη ομάδα εντάχθηκαν 80 ασθενείς μικρότεροι ή ίσοι των 58 ετών. Η κατανομή των γονοτύπων φαίνεται στον Πίνακα 19 και η κατανομή των αλληλομόρφων στον Πίνακα 20.

Κατανομή γονοτύπων	>58 ετών	≤58 ετών
DD	32	30
ID	47	39
II	17	11

**Πίνακας 19:** Κατανομή γονοτύπων σε ασθενείς μεγαλύτερους και μικρότερους των 58 ετών

Κατανομή αλληλομόρφων	>58 ετών	≤58 ετών
DD +ID (D αλληλόμορφο)	79	69
II+ ID (I αλληλόμορφο)	64	50

**Πίνακας 20:** Κατανομή αλληλομόρφων σε ασθενείς μεγαλύτερους και μικρότερους των 58 ετών



Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν προέκυψε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (DD+ID vs II,  $p=0.475$  και ID+II vs DD,  $p=0.645$  με  $OR=1,2$ ). Σημαντικό αποτέλεσμα δεν προέκυψε ούτε κατά τις συγκρίσεις των δύο ομάδων με το σύνολο των ασθενών και την ομάδα των controls (π.χ. DD+ID vs II στην ομάδα  $\leq 58$ /controls,  $p=0.578$ ,  $OR=1.237$ ).

Θεωρώντας ως σημαντικό δείκτη όχι την ηλικία κατά την οποία υπέστησαν το ΑΕΕ, που οδήγησε στη νοσηλεία τους και στην ένταξή τους στη μελέτη, αλλά την ηλικία που είχαν υποστεί το πρώτο ΑΕΕ, προσπαθήσαμε να ελέγξουμε τη σχέση ανάμεσα στους γονοτύπους και στα αλληλόμορφα σε σχέση με την ηλικία, που υπέστησαν το πρώτο επεισόδιο. Ως όριο χρησιμοποιήσαμε τη διάμεση ηλικία, η οποία ήταν τα 52 έτη. Στο σύνολο των 176 ασθενών δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί η ηλικία του πρώτου ΑΕΕ στους 32 ασθενείς. Οι υπόλοιποι, οι οποίοι είχαν υποστεί το πρώτο ΑΕΕ από την ηλικία των 34 έως και την ηλικία των 70 ετών, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εντάχθηκαν 43 ασθενείς με ηλικία πρόκλησης πρώτου ΑΕΕ μετά την ηλικία των 52 ετών και στη δεύτερη 101 ασθενείς με πρώτο ΑΕΕ πριν ή κατά την ηλικία των 52 ετών. Η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων φαίνεται στους Πίνακες 21 και 22. Τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, μετά την ολοκλήρωση των συγκρίσεων των δύο ομάδων μεταξύ τους, της κάθε ομάδας με το σύνολο των ασθενών και με την ομάδα των controls (DD+ID vs II,  $p=0.803$  και ID+II vs DD,  $p=0.736$  από τη σύγκριση των δύο ομάδων μεταξύ τους).

Κατανομή γονοτύπων	>52 ετών	≤52 ετών
DD	17	36
ID	18	49
II	8	16

**Πίνακας 21:** Κατανομή γονοτύπων σε ασθενείς με πρώτο ΑΕΕ σε ηλικία >52 και ≤52 ετών



Κατανομή αλληλομόρφων	>52 ετών	≤52 ετών
DD +ID (D αλληλόμορφο)	45	85
II+ ID (I αλληλόμορφο)	26	65

**Πίνακας 22:** Κατανομή αλληλομόρφων σε ασθενείς με πρώτο ΑΕΕ σε ηλικία >52 και ≤ 52 ετών.

Υπολογίσαμε επίσης τους γονοτύπους και τα αλληλόμορφα του συνόλου των ασθενών, που είχαν υποστεί περισσότερα του ενός ΑΕΕ κατά το παρελθόν και αυτών που υπέστησαν και νέο ΑΕΕ κατά τα μετέπειτα χρόνια παρακολούθησης των ασθενών στα ΕΙ ως και το Δεκέμβριο του 2007. Σκοπός μας ήταν να προσπαθήσουμε να προσδιορίσουμε αν κάποιος γονότυπος ή αλληλόμορφο ήταν υπεύθυνο για πρόκληση πολλαπλών επεισοδίων ΑΕΕ. Στο σύνολο των ασθενών, 35 ασθενείς είχαν ήδη υποστεί ένα τουλάχιστον ΑΕΕ πριν από την ένταξή τους στη μελέτη και 33 ασθενείς εμφάνισαν και νέο επεισόδιο κατά την παρακολούθησή τους στα ΕΙ.στα μετέπειτα έτη Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 23 χωρίς στατιστική σημασία (DD+ID vs II,  $p=0.606$  και ID+II vs DD,  $p=0.882$ ).

Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων	Ασθενείς
DD	24
ID	35
II	9
DD +ID (D αλληλόμορφο)	59
II+ ID (I αλληλόμορφο)	44

**Πίνακας 23:** Κατανομή γονοτύπων και αλληλομόρφων σε ασθενείς με περισσότερα του ενός ΑΕΕ

Με βάση την κλίμακα Rankin Scale, εκτιμήθηκε η βαρύτητα της κατάστασης των ασθενών κατά τη νοσηλεία τους, δύο μήνες μετά το ΑΕΕ, ένα έτος μετά και στις λοιπές επισκέψεις τους. Στη μελέτη μας, χρησιμοποιήσαμε



την εκτίμηση της κατάστασης των ασθενών ένα έτος  $\pm$  1 μήνα μετά το ΑΕΕ. Για να μπορέσουμε να επεξεργαστούμε τα αποτελέσματα, ομαδοποιήσαμε περαιτέρω τους ασθενείς σε δύο ομάδες. Στην πρώτη συμπεριλήφθηκαν 132 ασθενείς, με βαθμολογία στην κλίμακα Rankin Scale από 0 έως και 2, και στη δεύτερη 43 ασθενείς με βαθμολογία από 3 έως και 5. Η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων στις δύο ομάδες φαίνεται στους Πίνακες 24 και 25. Δεν προέκυψε κάποιος γονότυπος ή κάποιο αλληλόμορφο να ευθύνεται για πρόκληση ΑΕΕ μεγαλύτερης βαρύτητας σύμφωνα με την κλίμακα Rankin Scale (DD+ID vs II,  $p=0.635$ . OR=1.26 και ID+II vs DD,  $p=0.847$ , OR=0.93).

Κατανομή γονοτύπων	RS:0,1,2	RS:3,4,5
DD	45	15
ID	64	22
II	23	7

*Πίνακας 24: Κατανομή γονοτύπων σε ασθενείς με RS:0,1,2 και RS:3,4,5*

Κατανομή αλληλομόρφων	RS:0,1,2	RS:3,4,5
DD +ID (D αλληλόμορφο)	109	37
II+ ID (I αλληλόμορφο)	87	28

*Πίνακας 25: Κατανομή αλληλομόρφων σε ασθενείς με RS:0,1,2 και RS:3,4,5*

Σε σχέση με τους προδιαθεσικούς παράγοντες κινδύνου στην πρόκληση ΑΕΕ, εξετάσαμε την υπέρταση και το δείκτη μάζας σώματος (BMI) για να αναδείξουμε πιθανή συσχέτιση με τους πολυμορφισμούς I/D. Οι κατανομές σε σχέση με την υπέρταση φαίνονται στους Πίνακες 26 και 27. Στο σύνολο των 176 ασθενών, 144 ασθενείς έπασχαν από υπέρταση και είχαν δείκτη μάζας σώματος BMI>30 (παχύσαρκοι) οι 50 ασθενείς. Στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα δεν προέκυψε ούτε ως προς την υπέρταση, ούτε ως προς το BMI. (DD+ID vs II,  $p=0.694$  και ID+II vs DD,  $p=0.455$  για την υπέρταση και DD+ID vs II,  $p=0.812$  και ID+II vs DD,  $p=0.652$  για το BMI).



Κατανομή γονοτύπων	Υπέρταση (+)	Υπέρταση (-)
DD	50	11
ID	69	16
II	25	5

**Πίνακας 26:** Κατανομή γονοτύπων σε ασθενείς με υπέρταση και χωρίς υπέρταση

Κατανομή αλληλομόρφων	Υπέρταση (+)	Υπέρταση (-)
DD +ID (D αλληλόμορφο)	119	37
II+ ID (I αλληλόμορφο)	84	31

**Πίνακας 27:** Κατανομή αλληλομόρφων σε ασθενείς με υπέρταση και χωρίς υπέρταση

Στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα δεν προέκυψε ούτε κατά τη σύγκριση των ασθενών με lacunars και υπέρταση με τα άτομα που είχαν υπέρταση στην ομάδα ελέγχου.

Αν και ως τώρα δεν υπάρχουν δεδομένα που να συνδέουν τους I/D πολυμορφισμούς του γονιδίου του αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου με το φύλο των ασθενών, προχωρήσαμε στη μελέτη των αποτελεσμάτων με βάση το φύλο των ασθενών. Η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων στα δύο φύλα φαίνονται στους Πίνακες 28 και 29.

Κατανομή γονοτύπων	Γυναίκες	Άντρες
DD	26	35
ID	32	54
II	2	27

**Πίνακας 28:** Κατανομή γονοτύπων σε γυναίκες και άντρες





Κατανομή αλληλομόρφων	Γυναίκες	Άντρες
DD +ID (D αλληλόμορφο)	58	89
II+ ID (I αλληλόμορφο)	34	81

**Πίνακας 29:** Κατανομή αλληλομόρφων σε γυναίκες και άντρες

- Σε σχέση με τους γονοτύπους, στους Πίνακες 30 και 31 αναφέρονται τα στατιστικά αποτελέσματα από τη σύγκριση των DD και II γονοτύπων με τους υπόλοιπους γονοτύπους αντίστοιχα. Προκύπτει ότι ο DD γονότυπος (ομοζυγωτία ως προς το D αλληλόμορφο) είναι επιβαρυντικός για τις γυναίκες με OR=1.770 χωρίς όμως το  $p=0.0835$  να είναι στατιστικά σημαντικό, όταν συγκρίναμε τις γυναίκες με τους άντρες. Σε ότι αφορά στο γονότυπο II, αυτός είναι προστατευτικός για τις γυναίκες με OR=0.1137 και  $p=0.0038$  ( $p<0.05$  στατιστικά σημαντικό).

Odds Ratio	$\frac{(pi_2)/(1-pi_2)}{(pi_1)/(1-pi_1)} = 1.770$	
Method	P-value(2-sided)	95.00% Confidence Interval
	0.0835	(0.9272, 3.378)

**Πίνακας 30:** Στατιστικά αποτελέσματα αναφορικά με το DD γονότυπο στις γυναίκες, συγκρινόμενες με τους άντρες ασθενείς

Odds Ratio	$\frac{(pi_2)/(1-pi_2)}{(pi_1)/(1-pi_1)} = 0.1137$	
Method	P-value(2-sided)	95.00% Confidence Interval
	0.0038	(0.02603, 0.4963)

**Πίνακας 31:** Στατιστικά αποτελέσματα αναφορικά με τον II γονότυπο στις γυναίκες, συγκρινόμενες με τους άντρες ασθενείς



Αντίστοιχα για τους άντρες, όταν αυτοί συγκρίθηκαν με τις γυναίκες ασθενείς) προέκυψε ότι ο II γονότυπος είναι επιβαρυντικός με OR=8.798 και ίδιο  $p=0.0038$  (Πίνακας 32). Για το DD γονότυπο δεν προέκυψε στατιστικά σημαντικό  $p=0.392$ .

Odds Ratio	$\frac{(pi_2)/(1-pi_2)}{(pi_1)/(1-pi_1)} =$	8.798
Method	P-value(2-sided)	95.00% Confidence Interval
	0.0038	(2.015 , 38.41)

**Πίνακας 32:** Στατιστικά αποτελέσματα αναφορικά με τον II γονότυπο στους άντρες, συγκρινόμενοι με τις γυναίκες ασθενείς

Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα συγκρίναμε τις γυναίκες ασθενείς με τις γυναίκες controls, ως προς το γονότυπο και ως προς το αλληλόμορφο, και τους άντρες ασθενείς με τους άντρες controls.

Αναφορικά με τις γυναίκες, προέκυψε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα για τη II ομοζυγωτία ( $p=0.0251$  και OR=0.1853), η οποία δρα προφυλακτικά (Πίνακας 33), και το D αλληλόμορφο, το οποίο δρα επιβαρυντικά στις γυναίκες ( $p=0.024$  και OR= 5.395).

Odds Ratio	$\frac{(pi_2)/(1-pi_2)}{(pi_1)/(1-pi_1)} =$	0.1853
Method	P-value(2-sided)	95.00% Confidence Interval
	0.0251	(0.04239 , 0.8105)

**Πίνακας 33:** Στατιστικά αποτελέσματα αναφορικά με τον II γονότυπο στις γυναίκες ασθενείς, συγκρινόμενες με τις γυναίκες controls



Για τους άντρες ασθενείς, όταν συγκρίναμε τους γονοτύπους και τα αλληλόμορφα με τους άντρες controls, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (DD+ID vs II,  $p=0.428$  και ID+II vs DD,  $p=0.678$ ).



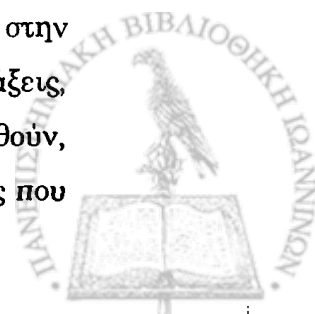
## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 6.1. ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΑ – ΠΟΛΥΓΟΝΙΔΙΑΚΑ-ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερος λόγος γίνεται σε σχέση με τη γενετική, τον τρόπο που αυτή επηρεάζει τα διάφορα νοσήματα και τη μοριακή βάση πολλών νοσημάτων. Σε πολλά μονογονιδιακά νοσήματα, όπως η μεσογειακή αναιμία, η επιστήμη της γενετικής με τη διάγνωση των φορέων, των πασχόντων και την προγεννητική διάγνωση έχει συμβάλλει τα μέγιστα στον έλεγχο της νόσου, στον περιορισμό του αριθμού των ατόμων που πάσχουν και στην καλύτερη ποιότητα ζωής των πασχόντων και των οικογενειών τους.

Τα πράγματα δεν είναι τόσο ξεκάθαρα όταν αναφερόμαστε σε πολυγονιδιακά νοσήματα, τα οποία προκαλούνται από την επίδραση και την αλληλεπίδραση πολλών διαφορετικών γονιδίων. Ακόμη όμως και σε νοσήματα, όπου τα αλληλόμορφα ή οι μεταλλάξεις που τα προκαλούν είναι γνωστές επακριβώς, δεν είναι δυνατό να προβλεφθεί ο φαινότυπος και η βαρύτητα της νόσου, εφόσον άτομα που φέρουν τα ίδια αλληλόμορφα ή τις ίδιες μεταλλάξεις μπορεί να έχουν διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά, ως αποτέλεσμα διαφόρων φαινομένων, που παρατηρούνται κατά την κληρονομηση των γονιδίων και των χαρακτηριστικών. Στον αντίποδα των ίδιων αλληλομόρφων και μεταλλάξεων, που μπορούν όμως να προκαλέσουν διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά, είναι η περίπτωση ατόμων με τον ίδιο ακριβώς φαινότυπο και τα κλινικά χαρακτηριστικά, που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Εύλογο προκύπτει το συμπέρασμα ότι ακόμη και το πιο απλό γενετικό νόσημα μπορεί να έχει την πολυπλοκότητά του στον τρόπο που κληρονομείται, οφειλόμενη σε φαινόμενα όπως η ατελής διεισδυτικότητα, η γονεϊκή αποτύπωση, η μιτοχονδριακή κληρονομικότητα και η πληθυσμιακή ετερογένεια.

Στις περιπτώσεις των πολυπαραγοντικών νοσημάτων, των νοσημάτων δηλαδή που περιβαλλοντικοί προδιαθεσικοί παράγοντες εμπλέκονται στην πρόκληση της νόσου και αλληλεπιδρούν με πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις, υπάρχει μεγαλύτερη ακόμη πολυπλοκότητα και δυσκολία στο να απομονωθούν, να ταυτοποιηθούν οι υπεύθυνοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που



ευθύνονται για το νόσημα σε κάθε ασθενή και να αποδοθεί συνολικά σε ένα πληθυσμό ο σχετικός κίνδυνος για κάποιο γενετικό ή περιβαλλοντικό παράγοντα. Τα ΑΕΕ, τα οποία εμπίπτουν στην κατηγορία των νοσημάτων αυτών, ενέχουν ακριβώς τη δυσκολία να υπολογίσουμε σε κάθε ασθενή που υφίσταται ΑΕΕ, αν αυτό οφείλεται στην επίδραση των περιβαλλοντικών ή των γενετικών παραγόντων κινδύνου.

Στις περιπτώσεις μελέτης ενός πολυπαραγοντικού νοσήματος, όπως είναι τα ΑΕΕ, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη, με κυριότερο τον καθορισμό των χαρακτηριστικών του νοσήματος και την επιβεβαιωμένη διάγνωση. Προς την κατεύθυνση αυτή τα διάφορα κριτήρια προσπαθούν να προσδιορίσουν επακριβώς τα κλινικά και παρακλινικά χαρακτηριστικά (πχ. μεταβολικό σύνδρομο, σχιζοφρένεια) που πρέπει να φέρουν οι πάσχοντες, έτσι ώστε με τη βεβαιότητα της διάγνωσης να αποφεύγονται λάθη, τουλάχιστον στο επίπεδο αυτό του σχεδιασμού των μελετών. Άλλοι παράγοντες, πλέον της επιβεβαιωμένης διάγνωσης, που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι η συχνότητα του πολυμορφισμού ή της μετάλλαξης στο γενικό πληθυσμό, η ομοιογένεια της ομάδας προς μελέτη και του συνολικού πληθυσμού, η σωστή επιλογή της ομάδας ελέγχου και η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου.

Αναφορικά με τα ΑΕΕ, έως τώρα έχουν διερευνηθεί διάφοροι πολυμορφισμοί διαφόρων γονιδίων, που εμπλέκονται σε διαφορετικά συστήματα με θετικά αποτελέσματα ως προς τη συσχέτιση κάποιων πολυμορφισμών με τον αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης ΑΕΕ. Παρόλα αυτά, δεν μπορεί να υποστηριχθεί η ύπαρξη σημαντικού ανεξάρτητου γονιδιακού πολυμορφισμού ως παράγοντα κινδύνου στην πρόκληση αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων. Πολυμορφισμοί, που φαίνεται να ευθύνονται για αυξημένη επίπτωση ΑΕΕ με μικρό ή μη στατιστικά σημαντικό κίνδυνο, όταν συνδυαστούν κατάλληλα μεταξύ τους μπορούν να αυξήσουν σημαντικά τον κίνδυνο επίπτωσης ΑΕΕ ή όταν συνδυαστούν με τους κατάλληλους περιβαλλοντικούς παράγοντες να οδηγήσουν στην πρόκληση ΑΕΕ.



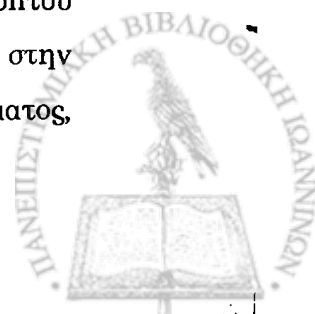
## 6.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ (GWAS) ΜΕ ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Οι μελέτες συσχέτισης του συνόλου του γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies - GWAS) ή αλλιώς μελέτες σάρωσης, αποτελούν ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για την αναγνώριση των προδιαθεσικών γονιδίων στα συχνά νοσήματα και δίνουν ελπίδες για τον εντοπισμό νέων στόχων φαρμακευτικής παρέμβασης, που απευθύνονται στα γενεσιουργά αίτια των νοσημάτων. Οι μελέτες αυτές προϋποθέτουν εξελιγμένη τεχνολογία υψηλής απόδοσης, η οποία επιτρέπει την ανάλυση χιλιάδων δειγμάτων από πληθυσμούς ή οικογένειες για εκατοντάδες χιλιάδες γονιδιακές θέσεις και σημειακούς πολυμορφισμούς. Για την ανάλυση των δεδομένων, που προκύπτουν, εφαρμόζονται πολύπλοκοι αλγόριθμοι που συγκρίνουν τις συχνότητες είτε των σημειακών πολυμορφισμών είτε των γονοτύπων είτε των απλοτύπων μεταξύ των ασθενών και των υγιών.

Οι σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονιδιακών συχνοτήτων οδηγούν στην αναγνώριση νέων προδιαθεσικών γονιδίων. Οι GWAS έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων αναγνώρισης προδιαθεσικών γονιδίων. Σε αντίθεση με τις κλασικές μελέτες συσχέτισης που βασίζονται σε επιλεγμένα, γνωστά ή ύποπτα γονίδια, οι GWAS επιτρέπουν τη σάρωση του γονιδιώματος χωρίς προηγούμενη υπόθεση ή προκατάληψη και έτσι επιτρέπουν τον εντοπισμό απολύτως νέων γονιδιακών προδιαθεσικών παραγόντων.

Επίσης σε σύγκριση με τις μελέτες ανάλυσης της γενετικής σύνδεσης (linkage analysis) σε οικογένειες, έχουν δύο σημαντικά πλεονεκτήματα. Το πρώτο είναι ότι παρέχουν πληροφορίες για όλους τους μειωτικούς ανασυνδυασμούς σε ένα πληθυσμό σε αντίθεση με τους ανασυνδυασμούς που εμφανίζονται μόνο στις οικογένειες της μελέτης. Το δεύτερο είναι ότι οι GWAS μπορούν να ταυτοποιήσουν πολλαπλά διαδραστικά υπεύθυνα γονίδια προσφέροντας μια ενδελεχή κατανόηση της παθοφυσιολογίας των νοσημάτων.

Η αξία της συσχέτισης μιας γενετικής παραλλαγής και ενός νοσήματος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η συχνότητα του υπόπτου αλληλομόρφου ή γονοτύπου, το σχετικό κίνδυνο που συνεισφέρει στην ανάπτυξη του νοσήματος, την γονιδιακή επίσταση, το μέγεθος του δείγματος, την επίπτωση του νοσήματος και τη γενετική ετερογένεια του πληθυσμού.



### 6.3. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ (GWAS) ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ

Σταδιακά τα τελευταία χρόνια αυξάνονται οι GWAS, λόγω της επίσης σταδιακής μείωσης του κόστους των μελετών ανά δείγμα και της βελτίωσης των τεχνολογικών υποδομών πολλαπλής γονιδιακής ανάλυσης. Επειδή ο όγκος των δεδομένων που προκύπτει από αυτές τις μελέτες είναι ιδιαίτερα μεγάλος και αξιοποιήσιμος από ολόκληρη την επιστημονική κοινότητα, έχει πρόσφατα δημιουργηθεί από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ (NIH) σχετική ιστοσελίδα αφιερωμένη στη σχέση γονοτύπου και φαινοτύπου σε μια σειρά από σημαντικά για τη δημόσια υγεία νοσήματα (data base Genotype and Phenotype - dbGaP). Σε αυτή τη μεγάλη βάση δεδομένων μπορεί κανείς να βρει τα αποτελέσματα μεγάλων μελετών στη Νευρολογία, που προέκυψαν, εκτός των άλλων, και από το κέντρο συλλογής δειγμάτων γενετικού υλικού (NINDS, National Institute of Neurological Disorders and Stroke). Από αυτά τα δείγματα πραγματοποιήθηκε η μελέτη ISGS (The Ischemic Stroke Genetics Study) ως Case-control μελέτη που περιελάμβανε 485 άτομα με ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια, που πληρούσαν συγκεκριμένα κριτήρια. Η μελέτη αυτή επιστράτευσε επίσης δείγματα ελέγχου από τον ίδιο πληθυσμό και δημοσιοποίησε τα πρώτα της αποτελέσματα το Μάιο του 2007 (176). Η πλατφόρμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν κατασκευασμένη από την εταιρεία ILLUMINA τύπου HumanHar300v1.1 με συνολικά 317.503 ανιχνευτές (probes) ανά μικροσυστοιχία (microarray slide) (176). Το πρωτόκολλο της μελέτης δημοσιεύθηκε αρχικά το 2003 στο BMC Neurology με σκοπό την προσέλκυση του ενδιαφέροντος εν δυνάμει συνεργατών και ερευνητών και ακολούθησε δημοσίευση και άλλων εργασιών (130,176,177,178,179,180).

Παρά την σημαντική πρόοδο και τις γνώσεις από τις μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος, οι απλές μελέτες συσχέτισης δεν χάνουν την αξία τους, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της σάρωσης (179,181). Αν και η παρούσα μελέτη ξεκίνησε όταν δεν υπήρχαν ακόμη οι μελέτες σάρωσης, τα αποτελέσματά της, όπως και άλλων σύγχρονων απλών μελετών συσχέτισης στη Νευρολογία, μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση των γενετικών προδιαθεσικών παραγόντων σε συγκεκριμένους



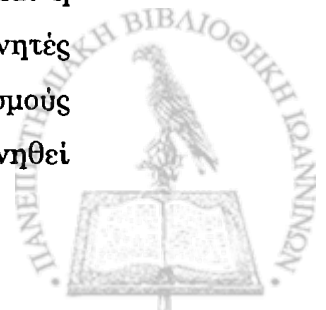
πληθυσμούς. Το σύστημα Ρενίνης-Αγγειτενοΐνης-Αλδοστερόνης (και ιδιαίτερα το γονίδιο του Μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης ACE) παραμένει ένα βιολογικό σύστημα που σχετίζεται με την υπέρταση, για την οποία τα αποτελέσματα των μελετών σάρωσης δεν απέδωσαν κανένα ουσιαστικό αποτέλεσμα (dbGaP).

Για να τονιστεί η σημασία των μελετών συσχέτισης, θα πρέπει να ανατρέξουμε στο παράδειγμα της πρώτης μεγάλης μελέτης πολυγονιδιακής σάρωσης σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό, τον πληθυσμό της Ισλανδίας, για τον οποίο υπάρχουν λεπτομερή αρχεία και νομοθετική ρύθμιση για τη δημιουργία αρχείων γενετικών δεδομένων ήδη πριν από μια δεκαετία. Σε αυτή τη μελέτη το αισιόδοξο εύρημα του εντοπισμού του γονιδίου PDE4D, ως αιτιολογικού παράγοντα των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων, δεν επιβεβαιώθηκε από άλλες απλές μελέτες συσχέτισης, σε σχεδόν κανένα άλλο πληθυσμό. Από το παράδειγμα αυτό φαίνεται ότι είναι απαραίτητη η συνέχιση του σχεδιασμού και εκτέλεσης μελετών συσχέτισης για την διερεύνηση και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των μελετών συσχέτισης του συνόλου του γονιδιώματος. Αυτή η ανάγκη γίνεται ακόμα μεγαλύτερη αν αναλογιστεί κανείς ότι αφενός ο αριθμός των νέων πολυμορφισμών, που μπορούν πλέον να αναλυθούν, έχει φτάσει στο 1.000.000 πολυμορφισμούς περίπου και ότι αφετέρου οι θετικά συσχετιζόμενοι μοριακοί δείκτες και πολυμορφισμοί από αυτές τις εξελιγμένες μελέτες σάρωσης είναι πολλοί περισσότεροι.

#### **6.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Οι πολυμορφισμοί του RAS εμπλέκονται σε πολλές μελέτες της τελευταίας δεκαετίας, που αφορούν στη σχέση τους με διάφορα νοσήματα, με κυριότερο την υπέρταση. Σε αρκετές εργασίες συγκεκριμένοι γονότυποι ή αλληλόμορφα έχουν συσχετισθεί με την υπέρταση (167,182,183), ενώ κάποιες άλλες δεν επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα (184).

Η προεκλαμψία (185), η ενδοκράνια αιμορραγία (186) η στεφανιαία νόσος (167,187,188), η υπερτοφία της αριστερής κοιλίας (189), η IgA και η διαβητική νεφροπάθεια (190,191) αποτελούν νόσους, με τις οποίες οι ερευνητές έχουν ασχοληθεί για ανάδειξη πιθανής σχέσης τους με τους πολυμορφισμούς του RAS, ειδικότερα με τους I/D πολυμορφισμούς του ACE. Έχει διερευνηθεί





ακόμη η σχέση των I/D πολυμορφισμών με το επίπεδο του μετατρεπτικού ενζύμου και της αγγειοτενσίνης I και II στο πλάσμα, με τις περισσότερες μελέτες να συμφωνούν ότι η παρουσία του D αλληλομόρφου αυξάνει τα επίπεδά τους στο πλάσμα (168,187). Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τους γονότυπους του RAS και με την ανταπόκριση στην αντιυπερτασική θεραπεία (192,193,194,195), με αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα.

Από ετών γίνεται προσπάθεια να διερευνηθεί ο ρόλος των πολυμορφισμών του RAS, και κυρίως των πολυμορφισμών I/D του αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου, με την πιθανότητα πρόκλησης ισχαιμικού ΑΕΕ και άλλες παραμέτρους των ΑΕΕ σε διάφορες ομάδες ασθενών, υπερτασικών και νορμοτασικών, με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Οι πολυμορφισμοί του RAS έχουν συσχετιστεί με την ηλικία εμφάνισης του αγγειακού επεισοδίου, τη βαρύτητα του επεισοδίου, την πρόγνωση του συγκεκριμένου επεισοδίου, την πιθανότητα επανεμφάνισης αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου ή καρδιοαγγειακού συμβάντος, το είδος του εφράκτου (νόσος μικρών αγγείων ή ισχαιμικό έμφρακτο μεγάλων αγγείων), την ύπαρξη αθηρωματικών πλακών στις καρωτίδες και το intimal-medial-thickness.

Αναφορικά με την επίπτωση ΑΕΕ, σε όλες σχεδόν τις μελέτες τα αποτελέσματα συσχέτισης των I/D πολυμορφισμών με τα ΑΕΕ είναι αρνητικά (138,173), όταν εξετάζονται στο σύνολό τους οι ασθενείς με ΑΕΕ και συγκρίνονται με μια ομάδα ελέγχου, αν και κάποιες ελάχιστες αναφορές θέλουν το D αλληλόμορφο να σχετίζεται με αυξημένη επίπτωση ΑΕΕ (196). Διαφορές, αναφορικά με τους πολυμορφισμούς, φαίνεται να προκύπτουν σε κάποιες εργασίες όπου λαμβάνεται υπόψιν η υποκατηγορία του ΑΕΕ, αφού το D αλληλόμορφο έχει συσχετισθεί με το είδος της ισχαιμικής βλάβης και συγκεκριμένα με μικροϊσχαιμικές βλάβες της λευκής ουσίας του εγκεφάλου ή με λευκοαραιώση (137,170,197,198) ενώ και ο γονότυπος DD έχει συσχετισθεί με μικροϊσχαιμικού τύπου βλάβες (144). Ως προς την κλινική εικόνα, το αλληλόμορφο D έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση συμπτωμάτων σε ασθενείς με μικροϊσχαιμικές βλάβες σε σύγκριση με άτομα που έφεραν μικροϊσχαιμικού τύπου βλάβες χωρίς όμως συμπτωματολογία (199).

Σε κάποιες άλλες εργασίες, παράμετροι, όπως η υπέρταση, λαμβάνονται υπ' όψιν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Για παράδειγμα σε μια μελέτη, όπου προσδιορίστηκε ο γονότυπος I/D του ACE σε 228 υπερτασικούς με και χωρίς lacunars στην MRI εγκεφάλου και 104 νορμοτασικούς ασθενείς, οι



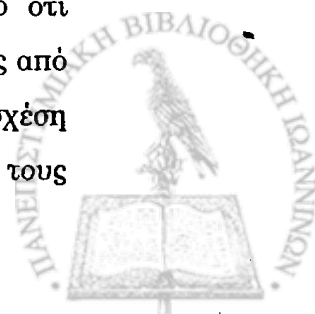
υπερτασικοί ασθενείς με lacunars είχαν αυξημένο ποσοστό του D αλληλομόρφου σε σχέση με τους νορμοτασικούς ενώ οι υπερτασικοί που δεν παρουσίαζαν βλάβες στην MRI δεν παρουσίαζαν καμιά διαφορά ως προς το γονότυπό τους και τα αλληλόμορφα που έφεραν, συγκρινόμενοι με τους νορμοτασικούς (169). Σε άλλες εργασίες δεν επιβεβαιώθηκε σχέση του I/D πολυμορφισμού με την πρόκληση ΑΕΕ ή με το είδος των προκαλούμενων εγκεφαλικών επεισοδίων (139,173,187,200).

Στη δική μας εργασία δεν υπήρξε κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ως προς την πρόκληση ΑΕΕ στους ασθενείς που έφεραν συγκεκριμένο γονότυπο ή αλληλόμορφο, όταν αυτοί συγκρίθηκαν με την ομάδα ελέγχου. Συγκρίνοντας τους υπερτασικούς με τους νορμοτασικούς ασθενείς, δε βρήκαμε διαφορά ως προς το γενετικό υλικό των δύο ομάδων. Όμως διαφορά δεν προέκυψε ούτε κατά τη σύγκριση των υπερτασικών ασθενών με lacunars και των υπερτασικών φυσιολογικών ατόμων της ομάδας των controls, έτσι ώστε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της μελέτης του Kario.

Σε σχέση με το είδος του ΑΕΕ, συγκρίνοντας τις υποομάδες των ασθενών με ισχαιμικό έμφρακτο των μεγάλων αγγείων και των ασθενών με μικροϊσχαιμικές βλάβες, καμιά διαφορά δεν ανευρέθη, ούτε κατά τη σύγκριση των δύο υποομάδων μεταξύ τους, ούτε κατά τη σύγκριση κάθε υποομάδας με την ομάδα ελέγχου.

Από τη βιβλιογραφία, ενδιαφέροντα ευρήματα είναι η στατιστικά σημαντική παρουσία του D αλληλίου στους ασθενείς με πρώτο επεισόδιο πριν από την ηλικία των 60 ετών και η μείωση του D αλληλίου με την πάροδο της ηλικίας στους ασθενείς με ΑΕΕ (133). Στην παρούσα μελέτη, δεν προέκυψε καμιά διαφορά ως προς την κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων αναφορικά με την ηλικία εμφάνισης του πρώτου ΑΕΕ, ούτε κατά τη σύγκριση της κατανομής των πολυμορφισμών και των αλληλομόρφων σε σχέση με τη χρονολογική ηλικία των πασχόντων.

Το D αλληλίο έχει συσχετισθεί επίσης με αυξημένη θνητότητα σε ασθενείς που είχαν υποστεί ΑΕΕ (135,136). Στη μελέτη του Catto, η αυξημένη θνητότητα συσχετίστηκε επίσης με μειωμένες τιμές μετατρεπτικού ενζύμου στο πλάσμα κατά την εμφάνιση του ισχαιμικού επεισοδίου. Με δεδομένο ότι κανένας από τους ασθενείς μας δεν κατέληξε μέσα στους επόμενους μήνες από την πρόκληση του ΑΕΕ, δεν κατέστη δυνατό να ελέγξουμε τη σχέση θνησιμότητας και γονοτύπου. Κατατάσσοντας όμως σε δύο ομάδες τους



ασθενείς, ανάλογα με τη βαρύτητα του επεισοδίου που είχαν υποστεί, δεν προέκυψε κανένα αξιολογικό αποτέλεσμα.

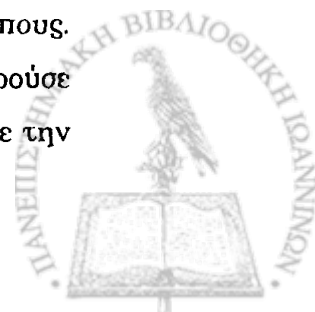
Με δεδομένο ότι ο DD γονότυπος έχει συσχετισθεί με την εξωκρανιακή στένωση των καρωτίδων (138) και το αυξημένο *intima media thickness* (171,172), προσπαθήσαμε και στη δική μας ομάδα ασθενών να προσδιορίσουμε τυχόν διαφορές ως προς το γονότυπο ή το αλληλόμορφο στους ασθενείς με παθολογικό και φυσιολογικό IMT, χωρίς όμως να αναδειχθεί στατιστικά σημαντικό εύρημα.

Επίσης δεν υπήρξε συσχέτιση των γονοτύπων με το σωματότυπο και το βάρος των ασθενών, όπως αυτός προσδιορίστηκε με τον υπολογισμό του BMI, αλλά και ούτε με την επαναληψιμότητα των επεισοδίων ΑΕΕ.

Ύδιαίτερη μνεία θα πρέπει να γίνει στην ανεύρεση σημαντικής στατιστικά σχέσης του αλληλομόρφου D και της ομοζυγωτίας II στις γυναίκες ασθενείς της ομάδας που μελετήσαμε και συγκεκριμένα στην ανεύρεση προφυλακτικής δράσης της ομοζυγωτίας II και επιβαρυντικής του αλληλομόρφου D στα θήλεα άτομα.

Έως τώρα έχουν περιγραφεί διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα, σε ότι αφορά στην υπέρταση, στη στεφανιαία νόσο και γενικά στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, αποδιδόμενες στην έμμεση επίδραση των οιστρογόνων στο προφίλ των παραγόντων κινδύνου, όπως τα επίπεδα χοληστερόλης, ο μεταβολισμός γλυκόζης και τα επίπεδα ινσουλίνης (201).

Σε μια μελέτη της ομάδας μας, όπου αναλύσαμε δύο πολυμορφισμούς του ESR1 υποδοχέα, αναδείχθηκε διαφορά στα δύο φύλα, με τους άνδρες ανάλογα με το γονότυπο που φέρουν να κινδυνεύουν να υποστούν ΑΕΕ σε νεότερη ηλικία (158). Οι θήλεις ασθενείς είχαν λιγότερο συχνά ένα συγκεκριμένο διπλότυπο CCGG έναντι των αρρένων ασθενών, δείχνοντας ότι ο διπλότυπος αυτός καθιστά τους άνδρες πιο ευάλωτους στην ανάπτυξη εγκεφαλικής ισχαιμίας έναντι των γυναικών (159,160). Τα αποτελέσματά μας αυτά ήταν σύμφωνα με μια προηγούμενη μελέτη, τη μελέτη Framingham, 2709 αρρένων συμμετεχόντων (202). Η μελέτη αυτή κατέδειξε μια αύξηση της αθηροθρομβωτικής καρδιαγγειακής πάθησης στους άνδρες με συγκεκριμένο γονότυπο (CC), με 3 φορές μεγαλύτερες πιθανότητες να παρουσιάσουν έμφραγμα του μυοκαρδίου έναντι των ατόμων με τους λοιπούς γονοτύπους. Επιπλέον, μια μελέτη περισσότερων από 7000 λευκών ανδρών, που αφορούσε επίσης στο ίδιο γονίδιο (203), παρείχε παρόμοια αποτελέσματα σε σχέση με την



πρόκληση θανατηφόρου οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, ενώ στη μελέτη Rotterdam (204) βρέθηκε ότι μετεμνηνοπαυσιακές γυναίκες με συγκεκριμένο διπλότυπο είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου και ισχαιμικών καρδιακών παθήσεων, ανεξάρτητα από τους γνωστούς καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου. Η κοινή άποψη της μελέτης Rotterdam και της δικής μας δουλειάς ήταν ότι συγκεκριμένοι διπλότυποι συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλικού και εμφράγματος του μυοκαρδίου στις γυναίκες και όχι στους άνδρες. Σε σχέση με τα γονίδια των υποδοχέων οιστρογόνων, τα αποτελέσματα μπορούν να δικαιολογηθούν από τη δράση των οιστρογόνων, εφόσον γνωρίζουμε ότι τα οιστρογόνα έχουν διαφορετική συγκέντρωση, τύπο και δραστηριότητα στα δύο φύλα αλλά και από τη διαφορετική κατανομή των υποδοχέων των οιστρογόνων στα δύο φύλο.

Στην περίπτωση των I/D πολυμορφισμών τα αποτελέσματά μας, σε ότι αφορά στις διαφορές των δύο φύλων, είναι αρκετά δύσκολο να δικαιολογηθούν με βάση τις καθιερωμένες γνώσεις. Διαφορές ως προς τα δύο φύλα, σε ότι αφορά στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, έχουν ανευρεθεί σε περιορισμένες μελέτες. Σε μια τέτοια μελέτη, όπου έλαβαν μέρος 50 υγιείς γυναίκες και 43 υγιείς άντρες προσδιορίστηκαν οι γονότυποι του RAS και μετρήθηκαν τα επίπεδα των αγγειοτενσινών, για να προκύψει ότι οι γυναίκες που έφεραν το DD γονότυπο είχαν αυξημένα επίπεδα αγγειοτενσίνης I (168). Σε μια άλλη μελέτη, όπου εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα στην αντιυπερτασική θεραπεία σε 35.048 συμμετέχοντες με υπέρταση ηλικίας μεγαλύτερης των 55 ετών, εκ των οποίων περίπου οι μισοί ήταν γυναίκες, δεν ανευρέθη διαφορά σε σχέση με τον I/D πολυμορφισμό και την αποτελεσματικότητα της αντιυπερτασικής θεραπείας (205), αλλά ανευρέθη σε σχέση με τον πολυμορφισμό του αγγειοτενσινογόνου, έχοντας ως συνέπεια γυναίκες με συγκεκριμένο αλληλόμορφο να έχουν καλύτερη απαντητικότητα στη θεραπεία και καλύτερη ρύθμιση της υπέρτασης. Επίσης με γνωστό το ρόλο της αγγειοτενσίνης στο ενδοθήλιο, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των πολυμορφισμών του RAS, που ελέγχουν την αγγειοτενσίνη, με την πρόκληση ανευρύσματος της κοιλιακής αορτής για να προκύψει ένα σημαντικό αποτέλεσμα που σχετίζεται με το φύλο, και συγκεκριμένα η στατιστικά σημαντική σύνδεση της DD ομοζυγωτίας με την πρόκληση ανευρύσματος στις γυναίκες σε ένα σύνολο 201 ασθενών (206) αλλά όχι στους άντρες.



Η έλλειψη αποτελεσμάτων από περισσότερες μελέτες, που να διερευνά πιθανή διαφορά των δύο φύλων στα ΑΕΕ, μπορεί να οφείλεται στο ότι δεν θεωρήθηκε εξ'αρχής ότι θα μπορούσαν να υπάρξουν διαφορές ως προς τα δύο φύλα, οπότε στο σύνολο σχεδόν των μελετών δε διερευνήθηκαν οι φυλετικές διαφορές. Σε εξαίρεση της πλεονότητας των μελετών, ήδη από το 1991 σε άρθρο ανασκόπησης από τους Bachmann και συνεργάτες συζητήθηκε για πρώτη φορά ο φυλετικός διμορφισμός στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης και στην αρτηριακή πίεση, με βάση επιδημιολογικά, βιολογικά μοριακά και άλλα στοιχεία (207). Τα κυριότερα στοιχεία που συνηγορούν υπέρ του διμορφισμού, προέρχονται από τη δράση των στεροειδών του φύλου (τεστοστερόνης και οιστρογόνων) στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Η ρύθμιση των γονιδίων του συστήματος RAS, μεταξύ αυτών και του γονιδίου του ACE, από την τεστοστερόνη και τα οιστρογόνα θα μπορούσε να εξηγήσει και τις διαφορές που παρατηρούνται στην απάντηση της αντιυπερτασικής αγωγής μεταξύ των δύο φύλων (205). Επιπλέον η ρύθμιση του συγκεκριμένου γονιδίου του ACE, σε αντίθεση με τα λοιπά γονίδια του RAS, φαίνεται ότι εξαρτάται περισσότερο από μη ειδικούς (γενικούς) παράγοντες, όπως οι ορμόνες γενικά και ειδικότερα τα οιστρογόνα (168,208).

Καταλήγοντας, πρέπει να γίνει κατανοητό ότι οι φυλοεξαρτώμενες διαφορές, σε σχέση με τα ΑΕΕ, δεν εξαντλούνται στις συγκρίσεις και στην ανεύρεση διαφορών αναφορικά με τη συμπτωματολογία, τη σημειολογία και τη βαρύτητα των επεισοδίων (209) ή τη διαφορετική διαγνωστική προσέγγιση των ασθενών των διαφορετικών φύλων (210). Σε γενετικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις, όπως και αποδείξεις, για τη διαφορετική ρύθμιση των γονιδίων και των πρωτεϊνών, που δεν εξαρτώνται μόνο από την αλληλεπίδραση με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, την αλληλουχία των γονιδίων και τον ιστό που εκφράζονται, αλλά και από το φύλο των ασθενών. Μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, εστιασμένες στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε φύλου, θα οδηγήσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια και αξιοπιστία σε συμπεράσματα που θα εμπλέκουν πολλαπλά γονίδια διαφορετικών συστημάτων με διαφορετική επίδραση στην προδιάθεση για ανάπτυξη νόσου, όπως τα ΑΕΕ, στα δύο φύλα.



## 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα μπορούσαν να συνοψιστούν στα ακόλουθα σημεία, που έχουν ιδιαίτερη σημασία για την πραγματοποίηση νέων μελετών, όπως και για την αξιολόγηση των συμπερασμάτων παλαιότερων.

Δεν υπήρξε κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ως προς την πρόκληση ΑΕΕ στους ασθενείς, που έφεραν συγκεκριμένο γονότυπο ή αλληλόμορφο, όταν αυτοί συγκρίθηκαν με την ομάδα ελέγχου. Διαφορά δεν προέκυψε ούτε από τις συγκρίσεις των υπομάδων, ανάλογα με το είδος του ισχαιμικού ΑΕΕ που είχαν υποστεί, σε αντίθεση με κάποιες παλιότερες μελέτες.

Δεν υπήρξε συσχέτιση των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων με την ηλικία των ασθενών ούτε με την ηλικία που είχαν υποστεί το πρώτο εγκεφαλικό ισχαιμικό επεισόδιο. Σχέση δεν αναδείχθηκε με το σωματότυπο και το βάρος των ασθενών (BMI), ούτε με τη συστηματική αθηρωμάτωση, όπως αυτή εκφραζόταν με τη μέτρηση του πάχους του μέσου χιτώνα του ενδοθηλίου των καρωτίδων (IMT).

Ούτε η βαρύτητα αλλά ούτε και η επαναληψιμότητα των επεισοδίων ΑΕΕ αποδείχτηκε να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική σχέση με τους πολυμορφισμούς και τους γονοτύπους που μελετήσαμε.

Συγκρίνοντας τους υπερτασικούς με τους νορμοτασικούς ασθενείς, δεν αναδείχθηκε διαφορά ως προς το γενετικό υλικό των δύο ομάδων, ούτε επίσης προέκυψε διαφορά από τη σύγκριση των υπερτασικών με lacunars και των υπερτασικών της ομάδας ελέγχου.

Ανευρέθη σημαντική στατιστικά σχέση του αλληλομόρφου D και της ομοζυγωτίας II στις γυναίκες ασθενείς της ομάδας που μελετήσαμε, και συγκεκριμένα προφυλακτική δράση της ομοζυγωτίας II και επιβαρυντική του αλληλομόρφου D στα θήλεα άτομα.

Ο φυλετικός διμορφισμός στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης και στην αρτηριακή πίεση, με βάση επιδημιολογικά, βιολογικά και μοριακά στοιχεία και η ρύθμιση των γονιδίων του συστήματος RAS, μεταξύ αυτών και του



γονιδίου του ACE, από την τεστοστερόνη και τα οιστρογόνα θα μπορούσε να εξηγήσει τις διαφορές που προέκυψαν στην παρούσα διατριβή και τις διαφορές που έχουν περιγραφθεί αναφορικά με την απάντηση στην αντιυπερτασική αγωγή μεταξύ των δύο φύλων.

Ειδικότερα η ρύθμιση του γονιδίου του ACE, σε σχέση με τα λοιπά γονίδια του RAS, εξαρτάται περισσότερο από μη ειδικούς παράγοντες, όπως οι ορμόνες γενικά και ειδικότερα τα οιστρογόνα.

Μελέτες εστιασμένες στη γενετική σύγκριση των προδιαθεσικών παρογόντων του κάθε φύλου, θα οδηγήσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια σε γονίδια διαφορετικών συστημάτων με φυλοκαθοριζόμενη προδιάθεση για ανάπτυξη πολυπαραγοντικών νόσων, όπως τα ΑΕΕ.



# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυμορφισμοί του συστήματος ρενίνης - αγγειοτενσίνης - αλδοστερόνης, και κυρίως ο πολυμορφισμός I/D του μετατρεπτικού ενζύμου, έχουν συσχετισθεί ή έχει γίνει προσπάθεια να συσχετιστούν με την επίπτωση και τη βαρύτητα διαφόρων νόσων, όπως είναι η υπέρταση, η προεκλαμψία, η στεφανιαία νόσος, η διαβητική νεφροπάθεια, η IgA νεφροπάθεια, η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια. Σε σχέση με τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΑΕΕ), πολλές εργασίες μελετούν τη σχέση των γονοτύπων και των αλληλομόρφων I/D με την πιθανότητα εμφάνισης ΑΕΕ, τον τύπο του ΑΕΕ, την ηλικία των ασθενών, τη βαρύτητα του επεισοδίου και τη θνησιμότητα, τη συνύπαρξη αρτηριακής υπέρτασης, την παρουσία καρωτιδικών πλακών, το intima media thickness (IMT) και άλλες παραμέτρους με αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Μέσα στον ορυμαγδό των διαφορετικών μελετών με τα ποικίλα αποτελέσματα, συγκεντρώσαμε τους ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ που νοσηλεύτηκαν στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, ηλικίας μικρότερης ή ίσης των 70 ετών, σε διάστημα 36 μηνών, προκειμένου να επανεξετάσουμε όλες σχεδόν τις γνωστές βιβλιογραφικά παραμέτρους σε σχέση με το γενετικό τους υπόστρωμα ως προς τον I/D πολυμορφισμό, στο δικό μας κλειστό γεωγραφικά πληθυσμό της Βορειοδυτικής Ελλάδος.

Αφού αποκλείσαμε άλλες πιθανές αιτίες, ως υπεύθυνες για πρόκληση του ισχαιμικού επεισοδίου, όπως είναι η ύπαρξη εμβολογόνου εστίας, η ύπαρξη ανοσολογικής διαταραχής ή διαταραχής του πηκτικού μηχανισμού, καταλήξαμε σε ένα σύνολο 176 ασθενών, 60 γυναικών και 116 αντρών, το οποίο συγκρίθηκε με 178 υγιή άτομα παρόμοιας ηλικίας και φύλου και με παρόμοιους γνωστούς προδιαθεσικούς παράγοντες στην πρόκληση ΑΕΕ. Στους ασθενείς αυτούς έγινε πλήρης κλινικός και παρακλινικός έλεγχος, καταγραφή των δημογραφικών στοιχείων και των στοιχείων του ιστορικού τους και εξαγωγή DNA προς προσδιορισμό του πολυμορφισμού που έφεραν. Καταγραφή δημογραφικών στοιχείων και στοιχείων του ιστορικού και εξαγωγή DNA διενεργήθηκε και στην ομάδα ελέγχου.





Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των δύο ομάδων, δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ως προς την επίπτωση των ΑΕΕ, την υποκατηγορία των ΑΕΕ, την ηλικία των ασθενών, την ηλικία εμφάνισης του πρώτου επεισοδίου, τη βαρύτητα και την επαναληψιμότητα των επεισοδίων, την υπέρταση, το βάρος των ασθενών και το ΙΜΤ των καρωτίδων. Σημαντικά στατιστικό αποτέλεσμα προέκυψε κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε σχέση με το φύλο των ασθενών, με τις γυναίκες που φέρουν την ΙΙ ομοζυγωτία να έχουν μειωμένο κίνδυνο να υποστούν ΑΕΕ, συγκρινόμενες με τους άντρες ασθενείς ( $p=0.038$ ,  $OR=0.1137$ ) και συγκρινόμενες με τις υγιείς γυναίκες της ομάδας ελέγχου ( $p=0.0251$ ,  $OR=0.1853$ ). Μέσα από την ίδια στατιστική ανάλυση προέκυψε το αλληλόμορφο D να δρα επιβαρυντικά στις γυναίκες ( $p=0.024$ ,  $OR=0.024$ ) και προφυλακτικά στους άντρες, ως προς την πρόκληση ΑΕΕ.

Ελάχιστες μελέτες που αφορούν στον I/D πολυμορφισμό έχουν εξετάσει τη διαφορετική κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων στα δύο φύλα και καμία δεν αφορά στην πρόκληση ΑΕΕ. Γνωρίζουμε για παράδειγμα ότι η ομοζυγωτία DD έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα αγγειοτενσίνης στις γυναίκες και ότι ευθύνεται για πρόκληση ανευρύσματος κοιλιακής αορτής επίσης στις γυναίκες αλλά σε επίπεδο πρόκλησης ΑΕΕ και σύνδεσης των πολυμορφισμών με το φύλο έχουν πολλά να γίνουν ακόμη.

Η απάντηση για το αποτέλεσμα, το οποίο προέκυψε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μπορεί να βρίσκεται στην αποδεδειγμένη βιβλιογραφικά διαφορά στην επίπτωση των ΑΕΕ στα δύο φύλα, που φέρουν διαφορετικό γενετικό υλικό ως προς τους υποδοχείς των οιστρογόνων, και στη επίδραση των οιστρογόνων στους πολυμορφισμούς του RAS και συνεπώς και στον I/D πολυμορφισμό. Όποιος και αν είναι ο ακριβής παθοφυσιολογικός μηχανισμός, που ευθύνεται για τη διαφορετική επίπτωση ΑΕΕ στα δύο φύλα με διαφορετικούς γονοτύπους και αλληλόμορφα ως προς τον I/D πολυμορφισμό, θα πρέπει αυτός να διερευνηθεί σε βάθος και να λάβουν χώρα μεγαλύτερες μελέτες με περισσότερους ακόμη πολυμορφισμούς και εστίαση στο διαχωρισμό θήλεων και αρρένων πασχόντων.



# *SUMMARY*

## *THESIS: I/D POLYMORPHISMS OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) AND STROKE*

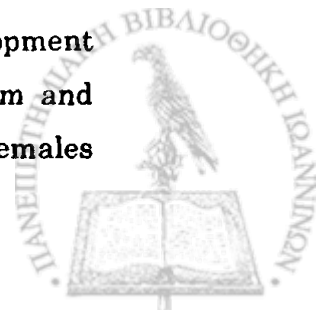
*Sofia Markoula*

*Neurologist*

Polymorphisms of the RAS genes and in particular the ACE I/D have been associated or have been tested for associations with a variety of multifactorial disorders, such as hypertension, preeclampsia, coronary artery disease, diabetic nephropathy or IgA nephropathy, intracranial hemorrhage and ischemic stroke. Regarding ischemic stroke, a number of studies has focused on the association of genotypes and I/D alleles with stroke incidence, the stroke subtype, the age at insult, the clinical severity, the morbidity, the coexistence of arterial hypertension, the carotid stenosis, the intima media thickness (IMT) and other critical parameters with conflicting results.

Amidst the bulk of different studies with positive and negative outcomes, we enrolled prospectively stroke patients, up to the age of 70, referred and hospitalized at the University Hospital of Ioannina and in particular at the Department of Neurology, for a period of 36 months, in order to reevaluate almost all the important parameters from the literature, in relation to their genetic background (ACE-I/D) in our virtually isolated population of Northwest Greece.

Having excluded other potential causative entities for the development of ischemic stroke, as for example immunological disorders, embolism and coagulation disorders, we focused on a sample size of 176 patients, 60 females



and 116 males, and a control sample of 178 individuals matched for age and gender, with similar known predisposing factors for ischemic stroke. A full clinical and laboratory assessment was performed in all patients, with report and classification of demographical data, disease and family history. In all patients and controls apart from the collection of similar data, DNA was extracted and stored for analysis

The results concerning comparisons of the two groups (patients and controls) were statistically negative as regards incidence, stroke subtype, age, age at first stroke, severity, recurrence, hypertension, weight (and related indexes) and IMT. Statistically significant result was present when the comparisons were performed separately in regard to patient and control gender. Women with II homozygosity had a lower risk for ischemic stroke, as compared to male patients and healthy control females ( $p=0.038$ ,  $OR= 0.1137$  and  $p= 0.0251$ ,  $OR= 0.1853$  respectively). The same statistical analysis revealed that the D allele is predisposing in women and protective in men for ischemic stroke.

Only few reports exploring the I/D polymorphism have studied the differential distribution of genotypes and alleles between the two genders and none has reported these differences in ischemic stroke. We know for example that DD homozygosity has been associated with higher levels of angiotensin in women and that is also responsible for abdominal aortic aneurisms in women, but as concerns ischemic stroke and gender specific predisposition, there is still lack of evidence. Support for the results of this thesis is provided by the accredited bibliography accumulated on the incidence of ischemic stroke differences between sexes, that have different physiology, genetic background, differences in steroid hormone receptor tissue distributions and other related differences. In particular evidence strongly support that estrogen regulates ACE mRNA transcription, also in relation to ACE I/D polymorphism. Regardless the exact and in detail pathophysiology of gender specific stroke incidence, many sex influenced genes, as for example ACE I/D genotypes and alleles, should be considered in many more female samples, or in many more samples of both sexes, in order to reassure power and validity of sex differences in ischemic stroke.



# *BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ*

1. Robbins and Cotran. Pathologic basis of disease. (2005) St. Louis. Mo: Elsevier. Saunders. Cotran RS, Kumar V, Fausto N, Robbins SL., Abbas AK.
2. Feigin VL. Stroke epidemiology in the developing world. (2005) *Lancet* ;365:2160-2161.
3. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. (1997) *Lancet*; 349: 1269–1276.
4. Bamford JM. The role of the clinical examination in the subclassification of stroke. (2000) *Cerebrovasc. Dis*;10:2–4.
5. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, et al. (1991) Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet* ; 337: 1521–1526.
6. Wardlaw JM, West TM, Sandercock PA, et al. (2003) Visible infarction on computed tomography is an independent predictor of poor functional outcome after stroke, and not of haemorrhagic transformation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;74:452-458.
7. Kidwell CS, Chalela JA, Saver JL, et al. (2004) Comparison of MRI and CT for detection of acute intracerebral hemorrhage. *JAMA*;292:1823-1830.
8. Schellinger PD, Fiebach JB. (2004) Intracranial hemorrhage: the role of magnetic resonance imaging. *Neurocrit Care*;1:31-45.
9. Wardlaw JM, Keir SL, Seymour J, et al. (2004) What is the best imaging strategy for acute stroke? *Health Technol Assess*;8: iii, ix-x, 1-180.
10. Chalela JA, Kidwell CS, Nentwich LM, et al. (2007) Magnetic resonance imaging and computed tomography in emergency assessment of patients with suspected acute stroke: a prospective comparison. *Lancet*;369:293-298.



11. von Kummer R, Bourquain H, Bastianello S, et al. (2001) Early prediction of irreversible brain damage after ischemic stroke at CT. *Radiology*;219:95-100.
12. von Kummer R, Meyding-Lamade U, Forsting M, et al. (1994) Sensitivity and prognostic value of early CT in occlusion of the middle cerebral artery trunk. *Am J Neuroradiol*; 15:9-18.
13. Dzialowski I, Weber J, Doerfler A, et al. (2004) Brain tissue water uptake after middle cerebral artery occlusion assessed with CT. *J Neuroimaging*;14:42-48.
14. Dzialowski I, Klotz E, Goericke S, et al. (2007) Ischemic brain tissue water content: CT monitoring during middle cerebral artery occlusion and reperfusion in rats. *Radiology*;243:720-726.
15. Lev MH, Gonzalez RG, Schaefer PW, et al. (2006) Cerebral blood flow thresholds in acute stroke triage. *Stroke*;37:1334-1339.
16. Wintermark M, Reichhart M, Thiran JP, et al. (2002) Prognostic accuracy of cerebral blood flow measurement by perfusion computed tomography, at the time of emergency room admission, in acute stroke patients. *Ann Neurol*;51:417-432.
17. Dimigen M, Keir S, Dennis M, Wardlaw J. (2004) Long-term visibility of primary intracerebral hemorrhage on magnetic resonance imaging. *J Stroke Cerebrovasc Dis*;13:104-108.
18. Ay H, Oliveira-Filho J, Buonanno FS, et al. (2002) Footprints of transient ischemic attacks: a diffusion-weighted MRI study. *Cerebrovasc Dis*;14:177-186.
19. Fiehler J, Knudsen K, Kucinski T, et al. (2004) Predictors of apparent diffusion coefficient normalization in stroke patients. *Stroke*;35:514-519.
20. Oppenheim C, Lamy C, Touze E, et al. (2006) Do transient ischemic attacks with diffusion-weighted imaging abnormalities correspond to brain infarctions? *AJNR Am J Neuroradiol*;27:1782-1787.
21. Wardlaw JM, Keir SL, Bastin ME, et al. (2002) Is diffusion imaging appearance an independent predictor of outcome after ischemic stroke? *Neurology*;59:1381-1387.



22. Hand PJ, Wardlaw JM, Rivers CS, et al. (2006) MR diffusion-weighted imaging and outcome prediction after ischemic stroke. *Neurology*;66:1159-1163.
23. Forsting M, Wanke I. (2003) Funeral for a friend. *Stroke*;34:1324-1332.
24. Willinsky RA, Taylor SM, TerBrugge K, et al. (2003) Neurologic complications of cerebral angiography: prospective analysis of 2,899 procedures and review of the literature. *Radiology*;227:522-528.
25. Wardlaw JM, Chappell FM, Best JJ, et al. (2006) Non-invasive imaging compared with intra-arterial angiography in the diagnosis of symptomatic carotid stenosis: a meta-analysis. *Lancet*;367:1503-1512.
26. Wardlaw JM, Chappell FM, Stevenson M, et al. (2006) Accurate, practical and cost-effective assessment of carotid stenosis in the UK. *Health Technol Assess*;10:iii-iv, ix-x, 1-182.
27. Flossmann E, Rothwell PM. (2003) Prognosis of vertebrobasilar transient ischaemic attack and minor stroke. *Brain*;126:1940-1954.
28. Alexandrov AV, Burgin WS, Demchuk AM, et al. (2001) Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: sonographic classification and short-term improvement. *Circulation*;103:2897-2902.
29. Postert T, Federlein J, Przuntek H, Buttner T. (1997) Insufficient and absent acoustic temporal bone window: potential and limitations of transcranial contrast-enhanced color-coded sonography and contrast-enhanced power-based sonography. *Ultrasound Med Biol*;23:857-862.
30. Droste DW, Nabavi DG, Kemeny V, et al. (1998) Echocontrast enhanced transcranial colour-coded duplex offers improved visualization of the vertebrobasilar system. *Acta Neurol Scand*;98:193-199.
31. Droste DW, Jurgens R, Nabavi DG, et al. (1999) Echocontrast-enhanced ultrasound of extracranial internal carotid artery high-grade stenosis and occlusion. *Stroke*;30:2302-2306.
32. Droste DW, Jurgens R, Weber S, et al. (2000) Benefit of echocontrast-enhanced transcranial color-coded duplex ultrasound in the assessment of intracranial collateral pathways. *Stroke*;31:920-923.



33. Ringelstein E, Van Eyck S, Mertens I. (1992) Evaluation of cerebral vasomotor reactivity by various vasodilating stimuli: comparison of CO<sub>2</sub> to acetazolamide. *Cereb Blood Flow Metab*;12:162-168.
34. Nederkoorn PJ, van der Graaf Y, Hunink MG. (2003) Duplex ultrasound and magnetic resonance angiography compared with digital subtraction angiography in carotid artery stenosis: a systematic review. *Stroke*;34:1324-1332.
35. Ringelstein EB, Droste DW, Babikian VL, et al. (1998) Consensus on microembolus detection by TCD. International Consensus Group on Microembolus Detection. *Stroke*;29:725-729.
36. Markus HS, MacKinnon A. (2005) Asymptomatic embolization detected by Doppler ultrasound predicts stroke risk in symptomatic carotid artery stenosis. *Stroke*;36:971-975.
37. Collins R, Peto R, MacMahon S, et al. (1990) Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet*; 335: 827-838.
38. Whisnant JP. (1996) Effectiveness versus efficacy of treatment of hypertension for stroke prevention. *Neurology*; 46 : 301-307.
39. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, et al. (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*;360:1903-1913.
40. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*;352:837-853.
41. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, et al. (2005) Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet*; 366: 1279-1289.
42. Prospective studies collaboration. (1995) Cholesterol, diastolic blood pressure, and stroke: 13,000 strokes in 450,000 people in 45 prospective cohorts.. *Lancet*; 346 : 1647-1653.



43. Iso H, Jacobs DR, Wentworth D, et al. (1989) Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *N Engl J Med* ;320:904-910.
44. Hebert PR, Gaziano JM, Hennekens CH. (1995) An overview of trials of cholesterol lowering and risk of stroke. *Arch Intern. Med*;155:50-55.
45. O'Regan C, Wu P, Arora P, et al. (2008) Statin therapy in stroke prevention: a meta-analysis involving 121,000 patients. *Am. J. Med* 2008;121:24-33.
46. Wolf PA, D'Agostino RB, Kannel WB, et al. (1988) Cigarette smoking as a risk factor for stroke. The Framingham Study. *JAMA*;259:1025-1029.
47. Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Walker M. (1995) Smoking cessation and the risk of stroke in middle-aged men. *JAMA*;274:155-160.
48. Kawachi I, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. (1993) Smoking cessation and decreased risk of stroke in women. *JAMA*;269:232-236.
49. Iso H, Date C, Yamamoto A, et al. (2005) Smoking cessation and mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women: the JACC Study. *Am J Epidemiol*;161:170-179.
50. Abbott RD, Yin Y, Reed DM, Yano K. (1986) Risk of stroke in male cigarette smokers. *N Engl J Med*;315:717-720.
51. Colditz GA, Bonita R, Stampfer MJ, et al. (1988) Cigarette smoking and risk of stroke in middle-aged women. *N Engl J Med*;318:937-941.
52. Qureshi AI, Suri MF, Kirmani JF, Divani AA. (2005) Cigarette smoking among spouses: another risk factor for stroke in women. *Stroke*;36:74-76.
53. Shinton R, Beevers G. (1989) Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *BMJ*;298:789-794.
54. Kurth T, Gaziano JM, Berger K, et al. (2002) Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch Intern Med*;162:2557-2562.
55. Kurth T, Gaziano JM, Rexrode KM, et al. (2005) Prospective study of body mass index and risk of stroke in apparently healthy women. *Circulation*;111:1992-1998





56. Hu G, Tuomilehto J, Silventoinen K, et al. (2007) Body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio on the risk of total and type-specific stroke. *Arch Intern Med*;167:1420-1427.
57. Lee C, Folsom A, Blair S. (2003) Physical activity and stroke risk: A meta-analysis. *Stroke*;34:2475-2481.
58. Reynolds K, Lewis B, Nolen JD, et al. (2003) Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA*;289:579-588.
59. Mukamal KJ, Ascherio A, Mittleman MA, et al. (2005) Alcohol and risk for ischemic stroke in men: The role of drinking patterns and usual beverage. *Ann Intern Med*;142:11-19.
60. Joshipura KJ, Ascherio A, Manson JE, et al. (1999) Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA*;282:1233-1239.
61. The Homocysteine Studies Collaboration. (2002) Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*;288:2015-2022.
62. Dafer RM, Biller J. (2008) Antiphospholipid syndrome: role of antiphospholipid antibodies in neurology. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008;22:95-105. Elliott D. Migraine and stroke: current perspectives. *Neurol Res*;30:801-812.
63. Elliott D. (2008) Migraine and stroke: current perspectives. *Neurol res*;30:801-812.
64. Gold JI, Johnson CB, Treadwell MJ, et al. (2008) Detection and assessment of stroke in patients with sickle cell disease: neuropsychological functioning and magnetic resonance imaging. *Pediatr Hematol Oncol*;25:409-421.
65. Kwaan HC, Wang J. (2003) Hyperviscosity in polycythemia vera and other red cell abnormalities. *Semin Thromb Hemost*;29:451-458.
66. Matijevic N, Wu KK. H (2007) Hypercoagulable states and strokes. *Curr Atheroscler Rep* 2006;8:324-329. Westover AN, McBride S, Haley RW. Stroke in young adults who abuse amphetamines or cocaine: a population-based study of hospitalized patients. *Arch. Gen. Psychiatry*; 64 : 495-502.



67. Westover AN, McBride S, Haley RW. (2007) Stroke in young adults who abuse amphetamines or cocaine: a population-based study of hospitalized patients. *Arch. Gen. Psychiatry*; 64 : 495-502.
68. Cantu C, Arauz A, Murillo-Bonilla LM, et al. (2003) Stroke associated with sympathomimetics contained in over-the-counter cough and cold drugs. *Stroke*; 34 : 1667-1672.
69. Birge SJ. Hormone therapy and stroke. (2008) *Clin Obstet Gynecol*; 51:581-591.
70. Lobo RA. (2007) Menopause and stroke and the effects of hormonal therapy. *Climacteric*; 10:27-31.
71. Valham F, Moe T, Rabben T, et al. (2008) Increased risk of stroke in patients with coronary artery disease and sleep apnea: a 10-year follow-up. *Circulation*; 118:955-960.
72. Gaist D, Pedersen NL, Koskenvuo M, et al. (2003) Stroke research in GenomEUtwin. *Twin Res*; 6:442-447.
73. Rothwell PM, Giles MF, Chandratheva A, et al. (2007) Effect of urgent treatment of transient ischaemic attack and minor stroke on early recurrent stroke (EXPRESS study): a prospective population-based sequential comparison. *Lancet*; 370(9596):1432-42
74. Johnston SC, Gress DR, Browner WS, Sidney S. (2000) Short-term prognosis after emergency department diagnosis of TIA. *JAMA*; 284:2901-2906.
75. Trapl M, Enderle P, Nowotny M, et al. (2007) Dysphagia bedside screening for acute-stroke patients: the Gugging Swallowing Screen. *Stroke*; 38:2948-2952.
76. Zabalgaitia M, Halperin JL, Pearce LA, et al. (1998) Transesophageal echocardiographic correlates of clinical risk of thromboembolism in: "nonvalvular atrial fibrillation. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation III Investigators". *J Am Coll Cardiol*; 31:1622-1626.
77. Lyden P, Brott T, Tilley B, et al. (1994) Improved reliability of the NIH Stroke Scale using video training. NINDS TPA Stroke Study Group. *Stroke*; 25:2220-2226.
78. Lindstrom E, Boysen G, Christiansen L, et al. (1991) Reliability of Scandinavian neurological stroke scale. *Cerebrovasc Dis*; 1:103-107.



79. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*;333:1581-1587.
80. Wardlaw JM, Mielke O. (2005) Early signs of brain infarction at CT: observer reliability and outcome after thrombolytic treatment--systematic review. *Radiology*;235:444-453.
81. Patel SC, Levine SR, Tilley BC, et al. (2001) Lack of clinical significance of early ischemic changes on computed tomography in acute stroke. *JAMA*;286:2830-2838.
82. Hill MD, Rowley HA, Adler F, et al. (2003) Selection of acute ischemic stroke patients for intra-arterial thrombolysis with pro-urokinase by using ASPECTS. *Stroke*;34:1925-1931.
83. Barber PA, Demchuk AM, Zhang J, Buchan AM. (2000) Validity and reliability of a quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke before thrombolytic therapy. ASPECTS Study Group. Alberta Stroke Programme Early CT Score. *Lancet*;355:1670-1674.
84. Schwab S, Schwarz S, Spranger M, et al. (1998) Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. *Stroke*;29:2461-2466.
85. Steiner T, Ringel P, Hacke W. (2001) Treatment options for large hemispheric stroke. *Neurology*;57(5 Suppl 2):S61-68.
86. Straus SE, Majumdar SR, McAlister FA. (2002) New evidence for stroke prevention: scientific review. *JAMA*; 288:1388-1395.
87. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, et al. (2006) Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke*; 37:1583-1633.



88. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. (2002) *BMJ*; 324: 71-86.
89. Wang X, Qin X, Demirtas H, et al. (2007) Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet*;369:1876-1882.
90. Chambers BR, Donnan GA. (2005) Carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001923.
91. Halliday A, Mansfield A, Marro J, et al. (2004) Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet*;363:1491-1502.
92. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. (1991) Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med*;325:445-453.
93. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. (2004) Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA*;291:565-575.
94. Algra A, van Gijn J. (1996) Aspirin at any dose above 30 mg offers only modest protection after cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;60:197-199.
95. The Dutch TIA Trial Study Group. (1991) A comparison of two doses of aspirin (30 mg vs. 283 mg a day) in patients after a transient ischemic attack or minor ischemic stroke. *N Engl J Med*;325:1261-1266.
96. Farrell B, Godwin J, Richards S, Warlow C. (1991) The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: final results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;54:1044-1054.
97. Campbell CL, Smyth S, Montalescot G, Steinhubl SR. (2007) Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *JAMA*;297:2018-2024.



98. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, et al. (2006) Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med*;354:1706-1717.
99. Chimowitz MI, Lynn MJ, Howlett-Smith H, et al. (2005) Comparison of warfarin and aspirin for symptomatic intracranial arterial stenosis. *N Engl J Med*;352:1305-1316.
100. Diener HC, Cunha L, Forbes C, et al. (1996) European Stroke Prevention Study. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J Neurol Sci*;143:1-13.
101. Costa J, Ferro JM, Matias-Guiu J, et al. (2005) Triflusal for preventing serious vascular events in people at high risk. *Cochrane Database Syst Rev*:CD004296.
102. Halkes PH, van Gijn J, Kappelle LJ, et al. (2006) Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial. *Lancet*;367:1665-1673.
103. Chang YJ, Ryu SJ, Lee TH. (2007) Dose titration to reduce dipyridamole-related headache. *Cerebrovasc Dis* 2006;22:258-262.
104. Diener H, Davidai G. Dipyridamole and headache. *Future Neurology*;2:279-283.
105. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, et al. (2004) Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*;364:331-337.
106. Yusuf S, Zhao F, Mehta S, et al. (2001) The Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndroms without ST-segment elevation. *N Engl J Med*;345:494-502.
107. Neal B, MacMahon S, Chapman N. (2000) Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet*;356:1955-1964.



108. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, et al. (1997) Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet*;350:757-764.
109. Gueyffier F, Bulpitt C, Boissel JP, et al. (1999) Antihypertensive drugs in very old people: a subgroup meta-analysis of randomised controlled trials. INDANA Group. *Lancet*;353:793-796.
110. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. (2007) The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of H, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of C: 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*;28:1462-1536.
111. Mancia G. (2007) Optimal control of blood pressure in patients with diabetes reduces the incidence of macro- and microvascular events. *J Hypertens Suppl*;25 Suppl 1:S7-12.
112. Rashid P, Leonardi-Bee J, Bath P. (2003) Blood pressure reduction and secondary prevention of stroke and other vascular events: a systematic review. *Stroke*;34:2741-2748.
113. Group P. (1995) Post-stroke antihypertensive treatment study. A preliminary result. *Chin Med J*;108:710-717.
114. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, et al. (2000) Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*;342:145-153.
115. Bosch J, Yusuf S, Pogue J, et al. (2002) Use of ramipril in preventing stroke: double blind randomised trial. *BMJ*;324:699-702.
116. PROGRESS collaborative group. (2001) Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet*;358:1033-41.



117. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. (2003) The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*;289:2560-2572.
118. Psaty BM, Lumley T, Furberg CD, et al. (2003) Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *JAMA*; 289:2534-2544.
119. Bader M, Ganten D. (2002) It's renin in the brain: transgenic animals elucidate the brain renin angiotensin system. *Circ Res*;90:8-10.
120. Lonn EM, Yusuf S, Jha P, et al. (1994) Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation*;90:2056-2069
121. Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA, et al. (1992) Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*;3:327:725-727.
122. Yusuf S, Pepine CJ, Garces C, et al. (1992) Effect of enalapril on myocardial infarction and unstable angina in patients with low ejection fractions. *Lancet*;340 :1173-1178.
123. Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG et al. (1998) Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *LANCET*;35:1755-1762.
124. Lonn EM, Yusuf S, Dzavik V et al. (2001) Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation*;103:919-925.
125. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, et al. (2000) Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*;101:1372-1378.



126. Bosch J, Yusuf S, Pogue J, et al. (2002) Use of ramipril in preventing stroke: double blind randomised trial. *BMJ*;324:699-702.
127. Teo KK, Yusuf S, Pfeffer M, et al. (2002) Effects of long-term treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors in the presence or absence of aspirin: a systematic review. *Lancet*;360:1037-1043.
128. Fuster V, Ryden LE, Asinger RW, et al. (2001) ACC/AHA/ESC Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation) Developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*;104:2118-2150.
129. Elbaz A, Amarenco P. (1999) Genetic Susceptability and Ischaemic Stroke. *Current Opinion in Neurology*;12:47-55.
130. Meschia JF, Brott TG, Brown RD, et al. (2003) The Ischemic Stroke Genetics Study (ISGS) Protocol. *BMC Neurol*;3:4.
131. Natowicz M, Kelley RI. (1987) Mendelian etiologies of stroke. *Ann Neurol*;22:175-192.
132. Flossmann E, Rothwell PM. 2003(2003) Prognosis of vertebrobasilar transient ischaemic attack and minor stroke. *Brain*;126:1940-1954.
133. Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, et al. (2003) The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nat Gen*;35:131-138.
134. Fidani L, Goulas CA, Hatzitolios AI et al. (2007) Association of phosphodiesterase 4D gene G0 haplotype and ischaemic stroke in a Greek population. *European Journal of Neurology*;14: 745-749.
135. Doi Y, Yoshinary M, Yoshizumi H, et al. (1997) Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene in patients with thrombotic brain infraction. *Atherosclerosis*;1:45-150.





136. Catto A, Carter AM, Barrett JH, et al. (1996) Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism and Cerebrovascular Disease. *Stroke*;27:435-440.
137. Sierra C, Coca A, Gomez-Angelats E, et al. (2002) Renin-Angiotensin System Genetic Polymorphisms and Cerebral White Matter Lesions In Essential Hypertension. *Hypertension*;39:343-347.
138. Pfohl M, Fetter M, Koch M, et al. (1998) Association between angiotensin I-converting enzyme genotypes, extracranial artery stenosis, and stroke. *Atherosclerosis*;140:161-166.
139. Takami S, Imai Y, Katsuya T, et al. (2000) Gene polymorphisms of the Renin-Angiotensin System Associates with Risk for Lacunar Infarction- The Ohasama Study. *Atherosclerosis* ;13:121-127.
140. Eterović D, Titlić M Culić V, et al. (2007) Lower contribution of factor V Leiden or G202104 mutations to ischemic stroke in patients with clinical risk factors: pair-matched case-control study. *Clin Appl Thromb Hemost*;13:188-193.
141. Berge E, Haug KB, Sandset EC, et al. (2007) The factor V Leiden, prothrombin gene 20210GA, methylenetetrahydrofolate reductase 677CT and platelet glycoprotein IIIa 1565TC mutations in patients with acute ischemic stroke and atrial fibrillation. *Stroke*;38:1069-1071.
142. Kawamoto R, Kohara K, Oka Y, et al. (2005) An association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*;14:67-74.
143. Khaw AV, Kessler Ch. (2006) Stroke: epidemiology, risk factors, and genetics. *Hamostaseologie*;26:287-297.
144. Szolnoki Z, Maasz A, Magyari L, et al. (2007) The combination of homozygous MTHFR 677T and angiotensin II type-1 receptor 1166C variants confers the risk of small-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci*;31:201-207.
145. Bang CO, Park HK, Ahn Mym, et al. (2001) 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and insertion/deletion polymorphism of the tissue-type plasminogen



- activator gene in atherothrombotic stroke. *Cerebrovasc Dis*;11:294-299.
146. Hindorff LA, Scwartz SM, Siscovick DS, et al. (2002) The association of PAI-1 promoter 4G/5G insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction and stroke in young women. *J Cardiovasc Risk*;9:131-137.
147. Streifler JY, Rosenberg N, Chetrit A, et al. (2001) Cerebrovascular events in patients with significant stenosis of the carotid artery are associated with hyperhomocysteinemia and platelet antigen-1 (Leu33Pro) polymorphism. *Stroke*;32:2753-2758.
148. Nowak-Göttl U, Sträter R, Kosch A, et al. (2001) The plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 promoter 4G/4G genotype is not associated with ischemic stroke in a population of German children. Childhood Stroke Study Group. *Eur J Haematol*;66:57-62.
149. Hoekstra T, Geleijnse JM, Schouten EG, Kluft C. (2004) Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk. *Thromb Haemost*;9:861-872
150. Hetet G, Elbaz A, Gariépy J, et al. (2001) Association studies between haemochromatosis gene mutations and the risk of cardiovascular diseases; *Eur J Clin Invest*;31:375-377.
151. Njajou OT, Hollander M, Koudstaal PJ, et al. (2002) Mutation in the hemochromatosis gene (HFE) and stroke. *Stroke*;33:2363-2366.
152. Henskens LH, Kroon AA, van der Schouw YT, et al. (2007) RAS and nitric oxide synthase gene polymorphisms in relation to stroke. *Am J Hypertens*;20:764-770.
153. Berger K, Stogbauer F, Stoll M, et al. (2007) The Glu298Asp polymorphism in the nitric oxide synthase gene is associated with the risk of ischemic stroke in two large independent case-control studies. *Human Genet*;121:169-178.
154. Pedro-Botet J, Sentí M, Nogués X, et al. (1992) Lipoprotein and apolipoprotein profile in men with ischemic stroke. Role of lipoprotein(a), triglyceride-rich lipoproteins, and apolipoprotein E polymorphism. *Stroke*;23:1556-1562.



155. Couderc R, Mahieux F, Bailleul S, et al. (1993) Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular disease. A case-control study. *Stroke*;24:661-664.
156. Margaglione M, Seripa D, Gravina C et al. (1998) Prevalence of apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of ischemic stroke: an Italian Case-Control Study. *Stroke*;29:399-403.
157. Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ, et al. (2005) Estrogen receptor alpha gene variation and the risk for stroke. *Stroke*; 36: 2281-2282.
158. Lazaros L, Markoula S, Xita N, et al. (2008) Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with stroke risk in patients with metabolic syndrome. *Acta Neurol Scand*;117:186 –190.
159. Markoula S, Lazaros L, Xita N et al. (2008) Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and stroke. *Cerebrovasc Dis*;26:338.
160. Markoula S, Xita N, Lazaros L et al. (2008) Estrogen Receptor Gene Haplotypes and Diplotypes in the Risk of Stroke. *Stroke*. In press.
161. Voetsch B, Benke KS, Damasceno BP et al. (2002) Paraoxonase 192 Gln-Arg polymorphism. An independent Risk Factor for Nonfatal Arterial Ischemic Stroke among young adults. *Stroke*;33:1459-1464.
162. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. (2001) A major role for VCAM-1 but not ICAM-1 in early atherosclerosis. *J Clin Invest*;107:1255-1262.
163. Hoppe C, Klitz W, Cheng S, et al. (2004) Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood*;103:2391-2396.
164. Soubrier F, Alhenc-Gelas, Hubert C, et al. (1988) Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*;85:9386-9390.
165. Ay C, Bencur P, Vormittag R, et al. (2007) The angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and serum levels of angiotensin-converting enzyme in venous thromboembolism. Data from a case control study. *Thromb Haemost* ;98:777-782.
166. Szolnoki Z, Maasz A, Magyar L, et al. (2006) Coexistence of angiotensin II type-1 receptor A1166C and angiotensin-converting



- enzyme D/D polymorphism suggests susceptibility for small-vessel-associated ischemic stroke. *Neuromolecular Med*;8:353-360.
167. Tired L, Blanc H, Ruidavets JB, et al. (1998) Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *Projet d'Etude des Gènes de l'Hypertension Artérielle Sévère à modérée Essentielle. J Hypertens*;16:37-44.
168. Reyes-Engel A, Morcillo L, Aranda FJ et al. (2006) Influence of gender and genetic variability on plasma angiotensin peptides. *J Renin Angiotens Aldoster Syst* ;7:92-97.
169. Kario K, Kanai N, Saito K, et al. (1996) Ischemic Stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese Hypertensives. *Circulation*;93:1630-1633.
170. Watanabe Y, Ishigami T, Kawano Y et al. (1997) Angiotensin-Converting Enzyme Gene I/D Polymorphism and Carotid Plaques in Japanese. *Hypertension*;30:569-573.
171. Castellano M, Muiesan ML, Rizzoni D, et al. (1995) Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population. The Vobarno Study. *Circulation*;91:2721-2724.
172. Hosoi M, Nishizawa Y, Kogawa K, et al. (1996) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with carotid arterial wall thickness in non-insulin-dependent diabetic patients. *Circulation*;94:704-707.
173. Zee RYL, Ridker PM, Stampfer MJ et al. (1999) Prospective evaluation of the Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism and the risk of stroke: *Circulation*;99:340-343.
174. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. (1992) PCR detection of the insertion/ deletion polymorphism of the human angiotensin-converting enzyme gene (DCP1). *Nucleic Acid Res*;20:1433.
175. Shanmugan V, Sell KW, Seha BK. (1993) Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Applications*; 3:120-121.
176. Matar M, Brown WM, Scholz S, et al. (2007) A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release. *Lancet Neurol*; 6:414-20.



177. Meschia JF, Case D, Brown RD, et al. (2004) Stroke Family History Is Not a Determinant of 90-Day Outcomes: The Ischemic Stroke Genetics Study. *Annals of Neurology*; 56:S16.
178. Meschia JF, Barrett KM, Brott TG, et al. (2005) The Relationship Between Having and Reporting Neurological Deficits Does Not Differ By Patient Sex *Stroke*;36:442-422.
179. Meschia JF, Brott TG, Brown RD, et al. (2005) SWISS Study Group, ISGS Study Group, MSGD Study Group. Phosphodiesterase 4D and 5-lipoxygenase activating protein in ischemic stroke. *Ann Neurol*.;58:351-361.
180. Meschia JF, Case LD, Worrall BB, et al. (2006) Ischemic Stroke Genetics Study Group.: Family history of stroke and severity of neurologic deficit after stroke. *Neurology*;67:1396-1402.
181. Worrall BB, Brott TG, Brown RD Jr, et al. (2007) IL1RN VNTR polymorphism in ischemic stroke: analysis in 3 populations. *Stroke*.;38:1189-1196.
182. Jiang X, Sheng H, Li J, et al. (2008) Association between renin-angiotensin system gene polymorphism and essential hypertension: a community-based study. *J Hum Hypertens*. In press.
183. Caprioli J, Mele C, Mossali C, et al. (2008) Polymorphisms of EDNRB, ATG, and ACE genes in salt-sensitive hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*;86:505-510.
184. Harrap SB, Tzourio C, Cambien F, et al. (2003) The ACE gene I/D Polymorphism is not associated with the blood pressure and cardiovascular benefits of ACE inhibition. *Hypertension*;42:297-303.
185. Li H, Ma Y, Fu Q, Wang L. (2007) Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (ACE I/D) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) gene polymorphism and its association with preeclampsia in Chinese women. *Hypertens Pregnancy*;26:293-301.
186. Slowik A, Turaj W, Dziedzic T, et al. (2004) DD genotype of ACE gene is a risk factor for intracerebral hemorrhage. *Neurology*;63:359-361.
187. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjarg-Hansen A. (2000) ACE gene polymorphism in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vas Biol*;20:484-492.



188. Schunkert H. (1997) Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. *J Mol Med*;75:867-875.
189. Gomez-Angelats E, de la Sierra A, Enjuto M, et al. (2000) Lack of association between ACE gene polymorphism and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *J Hum Hypertens*;14:47-49.
190. Ruggenti P, Bettinaglio P, Pinares F, Remuzzi G. (2008) Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and renoprotection in diabetic and nondiabetic nephropathies. *Clin J Am Soc Nephrol*;3:1511-1525.
191. Hadjadj S, Tarnow L, Forsblom C, et al. (2007) EURAGEDIC (European Rational Approach for Genetics of Diabetic Complications) Study Group. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and diabetic nephropathy: case-control, haplotype, and family-based study in three European populations. *J Am Soc Nephrol*;18:1284-1291.
192. Slowik A, Dziedzic T, Pera J, et al. (2007) ACE genotype, risk and causal relationship to stroke: implications for treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*;9:194-204.
193. Arnett DK, Davis BR, Ford CE, et al. (2005) Pharmacogenetic association of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism on blood pressure and cardiovascular risk in relation to antihypertensive treatment: the Genetics of Hypertension-Associated Treatment (GenHAT) study. *Circulation*; 111: 3374-3383.
194. Baudin B. (2000) Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and drug response. *Clin Chem Lab Med*; 38: 853-856.
195. Schelleman H, Stricker BH, De Boer A, et al. (2004) Drug-gene interactions between genetic polymorphisms and hypertensive therapy. *Drugs*;64:1801-1816.
196. Gao X, Yang H, ZhiPing T. (2006) Association studies of genetic polymorphism, environmental factors and their interaction in ischemic stroke. *Neurosci Lett*; 398: 172-177.
197. Markus HS, Barley J, Lunt R, et al. (1995) Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism. *Stroke*; 26:1329-1333.



198. Hassan A, Lansbury A, Catto AJ, et al. (2002) Angiotensin converting enzyme insertion/deletion genotype is associated with leukoaraiosis in lacunar syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;72:343-346.
199. Zhang J-h, Kohara K, Yamamoto Y, et al. (2004) Genetic predisposition to Neurological symptoms in lacunar infarction. *Cerebrovasc Dis*; 17:273-279.
200. Notsu Y, Nabika T, Park H-Y, et al. (1999) Evaluation of genetic risk factors for silent brain infarction. *Stroke*;30:1881-1886.
201. Ho KJ and Liao JK. (2002) Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Mol Interv*;2: 219-228.
202. Shearman AM, Cupples LA, Demissie S, et al. (2003) Association between Estrogen Receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *J Am Med Assoc*; 290: 2263–2270.
203. Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ, et al. (2006) Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts. *Circ Res*; 98:590-592.
204. Schuit SC, Oei HH, Witteman JC, et al. (2004) Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *J Am Med Assoc*; 291:2969–2677.
205. Lynch AI, Arnett DK, Davis BR, et al. (2007) Sex-specific effects of the AGT-6 and ACE I/D on pulse pressure after 6 months on antihypertensive treatment : The GenHAT study. *Ann Hum Genet*;71: 735-745.
206. Lucarini L, Sticchi E, Sofi F, et al. (2008) ACE and TGFBR1 genes interact in influencing the susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*, In press.
207. Bachmann J, Feldmer M, Ganten U, et al. (1991) Sexual dimorphism of blood pressure: possible role of the renin-angiotensin system. *J Steroid Biochem Mol Biol* ; 40: 511-515.
208. Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, et al. (1999) Estrogen regulation of the angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* ;31:323-328.



209. Barrett KM, Brott TG, Brown RD Jr, et al. (2007) Sex differences in stroke severity, symptoms, and deficits after first-ever ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*; 16:34-39.
210. Leslie-Mazwi TM, Brott TG, Brown RD Jr, et al. (2007) Sex differences in stroke evaluations in the Ischemic Stroke Genetics Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*;16:187-193.

